

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



# Disfunción metabólica en la progresión de la artrosis

TESIS DOCTORAL  
ANE LARRAÑAGA VERA  
MADRID, 2017

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



# Disfunción metabólica en la progresión de la artrosis

TESIS DOCTORAL

ANE LARRAÑAGA VERA  
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

DIRECTORES: RAQUEL LARGO CARAZO y  
GABRIEL HERRERO-BEAUMONT CUENCA

LABORATORIO DE PATOLOGÍA OSTEOARTICULAR  
IIS-FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

# AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Raquel Largo y Gabriel Herrero-Beaumont, mis directores de tesis y mentores, la oportunidad que me dieron confiando en mí para la realización de esta tesis, y por guiarme durante todo el proceso.

Gracias también a la Fundación Conchita Rábago por la beca de investigación que me proporciono el soporte económico sin el cual no habría podido realizar esta tesis.

Especialmente, quiero agradecerles a todos los compañeros que he tenido a lo largo de estos cuatro años, que hayan mostrado una impresionante disposición a ayudarme tanto en lo profesional como en lo personal. Soy muy consciente de lo afortunada que he sido.

Finalmente agradecer también a mi familia y amigos todo su apoyo. Esto no habría sido posible sin ellos.

## RESUMEN

La artrosis, es una patología multifactorial, extremadamente común, que afecta a las articulaciones diartrodiales provocando dolor e incapacidad funcional, y para la que no existe ningún tratamiento. La recomendación más extendida para mejorar el pronóstico, es la modificación del estilo de vida para evitar factores de riesgo asociados a desordenes metabólicos como la diabetes y el síndrome metabólico. Un mayor conocimiento de los mecanismos celulares responsables de dichas asociaciones, sería fundamental para una mejor caracterización de la patogenia de la artrosis, facilitando así, nuevos abordajes terapéuticos.

Con el objetivo de profundizar en los mecanismos por los que la hiperglucemia y la hiperlipemia podrían modular la evolución de la artrosis, hemos desarrollado dos aproximaciones. Por un lado, pusimos a punto un sistema de cultivo en tres dimensiones de condrocitos primarios, artrósicos para estimularlos con altas concentraciones de glucosa. También, realizamos un estudio en pacientes artrósicos con alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Como resultado, hemos demostrado que una concentración elevada de glucosa induce un fenotipo hipertrófico en condrocitos artrósicos en cultivo, proceso que se inhibe cuando se impide la O- $\beta$ -N-Acetilglicosilación proteica. Observamos además, que los pacientes artrósicos con diabetes muestran un aumento en la expresión de marcadores de hipertrofia en el cartílago, superior al que observamos en los pacientes con artrosis sin alteraciones metabólicas.

Por otro lado, hemos trabajado con un modelo de artrosis en conejos con hiperlipemia para evaluar el efecto de la combinación de estos factores en los tejidos articulares, especialmente en la membrana adiposa infrapatelar. La hiperlipemia agravó el daño histológico en la membrana sinovial de los conejos artrósicos produciéndose una invasión de macrófagos, tejido fibrótico, incrementó la destrucción del tejido adiposo, reducción en el tamaño y el número de los adipocitos y reducción de los niveles de adipoquinas en la sinovial.

Este trabajo describe alguno de los mecanismos por los que la hiperlipemia y la hiperglucemia podrían agravar el desarrollo de la artrosis humana. Así, nuestros resultados apoyan la idea de la existencia de un fenotipo metabólico de artrosis. Asimismo, estos datos podrían abrir nuevas líneas de investigación sobre la O- $\beta$ -N-Acetilglicosilación de proteínas, y su posible modificación en el tratamiento de la artrosis o sobre la identificación de nuevas dianas en los distintos tejidos articulares, más allá del cartílago en pacientes con características distintivas como la dislipemia.



## ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is an extremely common multifactorial disease that affects diarthrodial articulations, causing pain and functional loss. There is not any available pharmacological treatment, and the most extended recommendation is to follow a healthy lifestyle in order to avoid metabolic disorder related risk factors, as obesity, diabetes or metabolic syndrome. A greater knowledge of the cellular mechanisms behind this association is essential for a better characterization of the pathogenesis of osteoarthritis, thus, facilitating new therapeutic approaches.

With the objective of deepening on the mechanisms by hyperglycemia and hyperlipemia, modulate the evolution of OA, we have developed two different approaches. First, we have worked with a three-dimensional primary osteoarthritic chondrocyte culture system to study the influence of high glucose concentrationse. We also performed a study in patients with impaired glucose metabolism. As a result, we have shown that a high concentration of glucose induces a hypertrophic phenotype in cultured chondrocytes. Also, that this process is inhibited when protein O- $\beta$ -N-Acetylglycosylation is impaired. Similarly, compared to osteoarthritic patients without identified metabolic alterations, patients with osteoarthritis and diabetes show an increase of hypertrophyc marker expression in the cartilage.

Second, we developed an osteoarthritic, hypercholesterolemic rabbit model to evaluate the effect of the combination of these factors on the articular tissues, especially in the infrapatellar adipose membrane. Hyperlipemia aggravated histological damage of the synovial membrane of this rabbits leading to macrophage invasion, fibrotic tissue, increased destruction of adipose tissue with reduced adipocyte size and a decrease of synovial adipokines.

This paper describes some of the mechanisms by which hyperlipemia and hyperglycemia aggravate the development of human OA. Therefore, our results support the idea of the existence of a metabolic phenotype of osteoarthritis. In addition, these data opens a field to research on protein O- $\beta$ -N-Acetylglycosylation, and its possible modification in the osteoarthritis treatment or in the identification of new pharmacologic targets in the different articular tissues, beyond the cartilage.

# ÍNDICE

Abreviaturas .....	v
Introducción .....	1
1.1    La artrosis .....	1
1.2    Tejidos articulares afectados en la OA .....	2
1.2.1    El cartílago articular .....	2
1.2.1.1    La hipertrofia condrocitaria en el desarrollo .....	3
1.2.1.2    El fenotipo de tipo hipertrófico en el cartílago OA .....	4
1.2.2    Formación de osteofitos .....	5
1.2.3    El hueso subcondral .....	6
1.2.3.1    Sistema OPG/RANK-L .....	7
1.2.4    La membrana sinovial .....	8
1.3    Heterogeneidad y factores de riesgo para la OA .....	9
1.4    Consecuencias de alteraciones metabólicas en el desarrollo de la OA y sus mecanismos .....	10
1.4.1    Asociación entre la diabetes Mellitus y la OA .....	10
1.4.1.1    Papel de la hiperglucemia en la OA .....	12
1.4.1.1.1    La O-GlcNac proteica .....	13
1.4.2    Asociación de las alteraciones del metabolismo lipídico con la OA .....	15
1.4.2.1    Papel de la obesidad en el desarrollo de la OA .....	15
1.4.2.1.1    Papel de la hipercolesterolemia en el desarrollo de la OA .....	16
1.4.2.2    Papel de las adipoquinas en la OA .....	18
1.4.2.2.1    Adiponectina .....	19
1.4.2.2.2    Leptina .....	19
2    Objetivos .....	21
3    Materiales y métodos .....	23
3.1    Estudios en Pacientes .....	24

3.2	Estudios en animales.....	24
3.2.1	Desarrollo del modelo combinado de hipercolesterolemia y OA en conejos.....	24
3.2.2	Estudio del hueso subcondral en un modelo de ratas diabéticas.....	28
3.3	Estudios histopatológicos.....	29
3.4	Inmunohistoquímica .....	30
3.5	Cuantificación de macrófagos y adipocitos por análisis de imagen.....	31
3.6	Cultivos de condrocitos en esferas de alginato.....	31
3.7	Extracción de proteína y cuantificación .....	33
3.8	Estudios de síntesis de proteínas .....	33
3.9	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) .....	34
3.10	Estudios de expresión génica .....	34
3.11	Análisis estadístico. ....	35
4	Resultados .....	36
4.1	Estudio de la de la hiperglucemia como inductor de la diferenciación hipertrófica de condrocitos. Papel de la modificación de proteínas por O-GlcNAc en este proceso.....	37
4.1.1	Estudio de marcadores de hipertrofia en cartílago de pacientes artrósicos con hiperglucemia.....	38
4.1.2	Efecto de elevadas concentraciones de glucosa in-vitro en condrocitos cultivados en esferas .....	39
4.1.2.1	Optimización del medio de cultivo para la observación de marcadores de hipertrofia en condrocitos artrósicos en 3D .....	40
4.1.2.2	Expresión de genes de hipertrofia en cultivos expuestos a alta concentración de glucosa.....	41
4.1.3	El papel de la O-GlcNAc proteica en la hipertrofia condrocitaria inducida por glucosa .....	43
4.1.4	Efecto de la concentración elevada de glucosa sobre el hueso subcondral y sobre la expresión de marcadores de remodelado óseo en condrocitos artrósicos .....	47
4.1.4.1	Disminución del ratio OPG/RANK-L in-vitro en respuesta a elevadas concentraciones de glucosa .....	47

4.1.4.2	Cuantificación de factores estructurales del hueso subcondral mediante $\mu$ CT .....	48
4.2	Influencia del incremento en la concentración de lípidos circulantes sobre la evolución de la OA en un modelo experimental en conejos .....	49
4.2.1	Caracterización metabólica del modelo .....	50
4.2.2	Efecto de la hiperlipidemia sobre la alteración del cartílago articular artrósico .....	51
4.2.3	Formación de Osteofitos .....	54
4.2.4	Remodelado Subcondral .....	55
4.2.5	Efecto de la hiperlipidemia sobre la inflamación de la membrana sinovial artrósica. ....	55
4.2.5.1	Evaluación de la sinovitis con el score de Krenn .....	55
4.2.5.2	Caracterización del Infiltrado macrofágico en la membrana sinovial inducida por hipercolesterolemia .....	57
4.2.5.3	Caracterización del estroma sinovial.....	58
4.2.5.4	Caracterización del tejido adiposo en la membrana sinovial.....	60
4.2.5.5	Expresión de marcadores proinflamatorios en la membrana sinovial .....	62
4.2.5.6	Expresión de adipocinas .....	64
5	Discusión .....	66
5.1	Inducción de marcadores de hipertrofia en cartílago de pacientes artrósicos con hiperglucemia.....	67
5.2	Altas concentraciones de glucosa inducen la expresión de MH <i>in-vitro</i> en condrocitos artrósicos.....	68
5.3	El papel de la O-GlcNAc proteica en la hipertrofia condrocitaria inducida por glucosa.....	69
5.4	Efecto de la concentración elevada de glucosa sobre el hueso subcondral y sobre la expresión de marcadores de remodelado óseo en condrocitos artrósicos.....	71
5.5	La modificación de los mecanismos patológicos de la OA como consecuencia del hipercolesterolemia en los tejidos articulares de conejos artrósicos.....	72
5.6	La hipercolesterolemia no provoca un mayor daño histológico en el cartílago de conejos artrósicos .....	72

5.7	Perdida de hueso subcondral inducida por hipercolesterolemia .....	74
5.8	La hipercolesterolemia induce la Invasión de macrófagos y perdida del tejido adiposo en la membrana sinovial .....	75
5.9	La expresión de adipoquinas en la membrana sinovial difiere de los niveles circulantes .....	77
6	Conclusiones .....	79
7	Bibliografía .....	81
8	Aportaciones Científicas.....	97

# ABREVIATURAS

<b>μCT</b>	Microtomografía Computarizada
<b>3D</b>	Tres dimensiones
<b>ABC</b>	Complejo de Avidina Biotina unido a peroxidasa
<b>ABCA1</b>	Transportador dependiente de la unión a adenosin trifosfato 1
<b>ACTL</b>	Sección del ligamento anterior cruzado
<b>ADAMTS5</b>	Disintegrina y Metaloproteasa con Motivos de Trombospondina
<b>AGG</b>	Agregano
<b>AKT</b>	Proteína Quinasa B
<b>ALP</b>	Fosfatasa Alcalina
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>APOA1</b>	Apolipoproteína A1
<b>BCA</b>	Ácido Bicinconínico
<b>BGLAP</b>	Proteína Gamma-Carboxiglutamato de hueso
<b>BMP</b>	Proteína Morfogenética del Hueso
<b>CIP</b>	Coctel Inhibidor de Proteasas
<b>COL1</b>	Colágeno de tipo I
<b>COL10</b>	Colágeno de tipo X
<b>COL2</b>	Colágeno de tipo II
<b>COL5</b>	colágeno de tipo V
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa-2
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DEXA</b>	Absorciometría de rayos x de doble energía

<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DMEM</b>	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DMO</b>	Densidad Mineral Ósea
<b>DON</b>	6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucina
<b>ECL</b>	Quimioluminiscencia mejorada
<b>EDTA</b>	Acido etilendiaminotetraacético
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehido 3-Fosfato Deshidrogenasa
<b>GFAT</b>	Glutamina:Fructosa-6-Fosfato-Amidotransferasa-1
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-Piperazineetanosulfónico
<b>HFD</b>	Dieta Rica en Lipidos
<b>HG</b>	Alta concentración de glucosa
<b>HPRT</b>	hipoxantina phosphoribosyltransferasa 1
<b>HU-FJD</b>	Hospital Universitario Fundación Jimenez Díaz
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IHH</b>	Indian Hedgehog
<b>IIS-FJD</b>	Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jimenez Díaz
<b>IL1<math>\beta</math></b>	Interleuquina 1 Beta
<b>IL-6</b>	Interleuquina 6
<b>IMC</b>	Índice de Masa Corporal
<b>iNOS</b>	Óxido Nítrico Sintasa Inducible
<b>ITS</b>	Insulina Transferrina Selenito
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad

<b>LXR</b>	Receptor X del Hgado
<b>MCP1</b>	Proteína quimioatrayente de monocitos
<b>MetS</b>	Sndrome Metabolico
<b>MH</b>	Marcadores de Hipertrofia
<b>MMP</b>	Metaloproteinasa
<b>Mn</b>	Manitol
<b>MPT</b>	Modificaci3n postraducciona
<b>OA</b>	Artrosis
<b>OE</b>	Osificaci3n Endocondral
<b>OGA</b>	N-Acetil-Beta-D-Glucosaminidasa
<b>O-GlcNAc</b>	O-N-AcetilGlicosilado
<b>OGT</b>	O-N-Acetilglucosamina Transferasa
<b>OMS</b>	Organismo Mundial de la Salud
<b>OPG</b>	Osteoprotegerina
<b>PAS</b>	Ácido peri3dico de Shiff
<b>PBS</b>	Buffer Fosfato Salino
<b>PCR</b>	Proteína C Reactiva
<b>PLIN-1</b>	Perilipina-1A
<b>PMSF</b>	Fenil Metil Sulfonil Fluoruro
<b>RANK</b>	receptor activador para el factor nuclear $\kappa$ B
<b>RANK-L</b>	Ligando del receptor activador para el factor nuclear $\kappa$ B
<b>RUNX2</b>	Factor de Transcripci3n 2 Relacionado con Runt
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato S3dico
<b>SEM</b>	Error Estandar de la Media



<b>SFT</b>	Suero Fetal de Ternera
<b>TBS</b>	Solución salina tamponada con Tris
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Factor de Crecimiento Transformante Beta
<b>Thi</b>	Thiamet-G
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
<b>TTG</b>	Test de Tolerancia a la Glucosa
<b>VBF</b>	Volumen de Fracción Ósea
<b>WNT</b>	Proteína de integración en Virus de Tumor Mamario Murino perteneciente a la Familia de las Proteínas Sin Alas

---

## INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 La artrosis

La artrosis (OA, del inglés *osteoarthritis*) es una patología degenerativa de larga duración que afecta a las articulaciones sinoviales provocando dolor y rigidez articular, que puede llegar incluso a impedir la movilidad. Es además enormemente común en personas de edad avanzada, se estima que afecta a más de la mitad de la población mayor de 65 años (Musumeci et al., 2015). La Organización Mundial de la Salud (OMS), en un informe que publicó en 2013 (Wittenauer et al., 2013), consideró que es la primera causa independiente responsable de la discapacidad entre las personas mayores. Asimismo, Un 80% de las personas que sufren OA tendrán limitaciones en el movimiento y un 25% no podrán llevar a cabo actividades de la vida diaria. Debido al cada vez mayor envejecimiento de la población, y a la mayor prevalencia de factores de riesgo asociados, todas las proyecciones auguran una creciente incidencia de OA en los próximos años, pudiendo llegar incluso a cuadruplicarse. Esto implica que, si no se revierte esta tendencia, el coste socio-económico que conllevará la OA podría llegar a ser extremadamente elevado.

Como agravante, hasta la fecha, no existen tratamientos farmacológicos aprobados que reviertan o detengan la progresión de la OA, por lo que, el único tratamiento disponible para los pacientes se limita a la administración de analgésicos para controlar el dolor. En los casos más graves, existe una alternativa quirúrgica que consiste en el remplazo total de la articulación por una prótesis. Sin embargo, esta intervención no está libre de riesgo y en un porcentaje de pacientes el dolor no desaparece (van Jonbergen et al., 2014).

Uno de los principales problemas para encontrar un tratamiento eficaz es la gran heterogeneidad que presenta la enfermedad, puesto que, actualmente se acepta que la OA es una enfermedad de órgano, y además de la pérdida y fibrilación del cartílago, por la que se ha caracterizado históricamente, los pacientes OA presentan distintos grados de esclerosis del hueso subcondral, formación de osteofitos, sinovitis y daño en los tejidos adyacentes como el músculo o los tendones (Goldring, 2012). Más aun, aunque se describe como una enfermedad asociada a la edad, se han identificado otros muchos factores que influyen en el desarrollo de la OA, como la presencia de lesiones articulares previas, el tabaco, el sexo, la predisposición genética o diversos desordenes metabólicos como la obesidad, la diabetes o el denominado síndrome metabólico (MetS) (Musumeci et al., 2015).

Sin embargo, a pesar de que la investigación en el área se ha intensificado considerablemente en los últimos años, existe un gran desconocimiento de los procesos celulares y moleculares responsables de estas comorbilidades. Por ello, un mayor conocimiento de los mismos,

profundizar en los factores de riesgo implicados y hacer una mejor clasificación de los pacientes artrósicos basada en los síntomas que presentan, abriría las puertas a encontrar un abordaje terapéutico eficaz para los distintos tipos de pacientes.

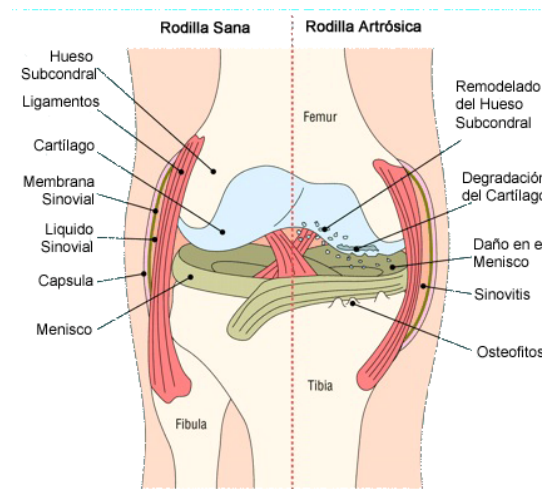


Figura 1: Características patogénicas de la OA. Modificado de (Johnson and Hunter, 2014)

## 1.2 Tejidos articulares afectados en la OA

Existe un conocimiento cada vez mayor de las lesiones que sufren los distintos tejidos que componen la articulación durante la OA, pero todavía se desconocen en gran medida las causas que llevan a una afectación mayor o menor en cada uno de estos tejidos y como se asocia esto a la gravedad de la patología. A continuación, se resume el estado del conocimiento actual sobre la función de distintos tejidos articulares y su afectación durante la OA.

### 1.2.1 El cartílago articular

El cartílago articular es responsable de reducir la fricción y amortiguar el impacto producido durante el movimiento. Es un tejido avascular, aneural y alinfático con una estructura elástica y resistente que recubre la superficie de las articulaciones. Está formado por un solo tipo celular denominado condrocito y una matriz compuesta principalmente de colágenos, proteoglicanos y agua (Wong and Carter, 2003). Como resultado del desarrollo y las fuerzas mecánicas a las que es sometido, la estructura del cartílago se puede dividir en varias capas, que tienen características morfológicas, bioquímicas y mecánicas distintas (Forriol Campos, 2002; Goldring, 2012; Sophia Fox et al., 2009)

En el cartílago sano, los condrocitos, como respuesta a distintos estímulos mecánicos, factores de crecimiento o interleuquinas, sintetizan y degradan continuamente los componentes de la

matriz extracelular renovando el tejido. Sin embargo, tienen una capacidad de reparación limitada frente al daño.

Durante la OA, el cartílago sufre un desequilibrio entre la degradación y la formación de nuevo cartílago. Los condrocitos normalmente quiescentes, se activan aumentando la producción de proteínas tanto catabólicas como anabólicas, y debido a la incapacidad de los condrocitos de regenerar una matriz con las cualidades originales, el cartílago pierde las propiedades físicas como la elasticidad o la resistencia a la compresión (Richard et al., 2013).

Esto ocurre a través de una degradación proteolítica del cartílago en la que participa la desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 5 (ADAMTS-5) que degrada agregano (AGG) y otros proteoglicanos que en cierta manera protegen la red de colágenos de la matriz. Una vez éstos desaparecen, se facilita la acción de distintas metaloproteinasas, como la metaloproteasa de la matriz 13 (MMP-13), con una gran afinidad por el colágeno de tipo II (COL2), que degradaran el entramado de colágenos. Cuando esto se produce, la degradación del cartílago se torna irreversible (Goldring and Marcu, 2009). Como consecuencia aparecen lesiones y el cartílago puede incluso desaparecer en algunas zonas, provocando que los huesos sufran fricción.

Estos cambios en la expresión de proteínas en el cartílago, se enmarcan dentro de un cambio fenotípico de los condrocitos que se activan sintetizando, además de los mencionados, mediadores propios de la etapa de hipertrofia condrocitaria característica de la osificación endocondral en el desarrollo embrionario y la placa de crecimiento del crecimiento del hueso (Dreier, 2010).

#### *1.2.1.1 La hipertrofia condrocitaria en el desarrollo*

Los huesos del esqueleto humano se forman a través de dos procesos distintos. El crecimiento del esqueleto craneofacial se produce como consecuencia de la osificación intramembranosa y en cambio, el crecimiento del esqueleto axial y apendicular ocurre través de la osificación endocondral (OE). La OE se caracteriza por la formación de cartílago que actúa como molde del futuro hueso. Un importante número de vías de señalización y factores de transcripción juegan un papel específico en este proceso, en el que la hipertrofia de los condrocitos tiene un papel central (Goldring and Marcu, 2009).

La OE se produce a partir de la condensación de células mesenquimales que expresan COL-1, 3 y 5, como consecuencia de un incremento en la expresión de AMPc, TGF $\beta$  y fibronectina. Así, se forman condroprogenitores, que a su vez, mediante la señalización por proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), comienzan a expresar el factor de transcripción Sox-9, el cual

compromete su entrada al proceso de condrogénesis (Bi et al., 1999). Una vez diferenciados, los condrocitos, empiezan a secretar componentes de la matriz del cartílago como los COL2, 9, 11 o agrecano (AGG).

En un primer momento, los condrocitos están en una fase denominada de reposo donde los condrocitos son pequeños, con una baja tasa de proliferación y se distribuyen uniformemente en la matriz (Dreier, 2010; Goldring, 2012). Más adelante, los condrocitos entran en una fase proliferativa donde adquieren una estructura más aplanada, se organizan formando columnas y secretan COL4 y matrilina. A continuación, como consecuencia de un incremento de la proteína Indian hedgehog (IHH) se inicia la diferenciación hipertrófica (Minina et al., 2002).

La hipertrofia condrocitaria, que provoca que el volumen celular se incremente en 10 veces (Bush et al., 2008), se caracteriza por la expresión del factor de transcripción 2 relacionado con Runt (RUNX2) que guía la expresión de marcadores como COL10, MMP13 o la fosfatasa alcalina (ALP). El MMP13 y la ADAMTS5 degradan el COL2 y el AGG de la matriz del cartílago permitiendo que el COL10 se deposite en la matriz. Como resultado, se forma un entramado de referencia para la posterior calcificación en la que la ALP, secretada como respuesta a las crecientes concentraciones de calcio, juega un papel fundamental (Studer et al., 2012).

Estos condrocitos hipertróficos calcifican la matriz extracelular que es invadida por vasos sanguíneos, y mueren por apoptosis, siendo remplazados por osteoclastos y precursores osteoblasticos que formarán un centro de osificación que finalmente reemplazará con hueso el cartílago (Solomon et al., 2008).

#### *1.2.1.2 El fenotipo de tipo hipertrófico en el cartílago OA*

Todos los condrocitos provienen de células madre mesénquimales. Sin embargo, el cartílago que será sustituido por hueso y el que formará parte de las articulaciones, sigue dos trayectorias distintas durante el desarrollo (Lawson et al., 2013). A diferencia de lo que ocurre durante la OE, el cartílago articular no pasa por las fases de proliferación e hipertrofia condrocitaria descritas anteriormente. En cambio, sus condrocitos se quedan en una etapa en la que mantienen un fenotipo estable de producción de matriz extracelular y baja tasa de proliferación. Actualmente, las diferencias en la regulación de los procesos que marcan esta diferencia están siendo intensamente investigadas y son fuente de debate.

Se ha postulado que, tras la etapa de desarrollo, el cartílago articular sano cuenta con mecanismos que bloquean los cambios hipertróficos o catabólicos característicos de la OE y que la pérdida de estos mecanismos que capacitan a los condrocitos para mantener su fenotipo estable es un posible inductor del desarrollo de la OA. Así, diversas vías que controlan la

diferenciación en la placa de crecimiento han demostrado estar activas o desreguladas en el cartílago OA y se cree que muchos factores de riesgo para la OA podrían modificar la actividad de las vías relacionadas con la expresión de SOX9, esencial para la transcripción de componentes de la matriz del cartílago hialino COL2 y AGG, o RUNX2, que guía diversos procesos en la hipertrofia condrocitaria. El equilibrio entre estos dos factores es determinante para el fenotipo condrocitario y una alteración del mismo causaría cambios en los condrocitos, que desembocarían en un fenotipo de tipo hipertrófico que recapitularía los procesos de OE (Caron et al., 2015; Goldring, 2012). Mediante estudios de asociación genética, se ha podido demostrar que mutaciones en genes con potencial para estimular vías capaces de inducir la hipertrofia, como por ejemplo la vía de señalización canónica de WNT a través de  $\beta$ -catenina, están asociados a una mayor susceptibilidad a padecer OA (Goldring et al., 2011).

Asimismo, distintas proteínas asociadas con la hipertrofia condrocitaria han demostrado estar estrechamente relacionados con evolución y la gravedad de la patología. Una modulación de la expresión de IHH, MMP13, RUNX2, ADAMTS5 o MMP13 entre otros, ha demostrado ser capaz de modificar el curso de la OA en diversos modelos experimentales (Kamekura et al., 2006; Little et al., 2009; Zhou et al., 2014)

#### 1.2.2 Formación de osteofitos

Un osteofito es un crecimiento óseo extensivo recubierto de fibrocartílago que aparece en una superficie ósea normal. Además del estrechamiento del espacio articular y la esclerosis subcondral, es una de las principales características radiográficas de la OA y un criterio diagnóstico importante para esta enfermedad. Los osteofitos pueden formarse en fases tempranas del desarrollo de la OA y en algunos casos ser observados antes que el estrechamiento del espacio articular. Tiene un efecto significativo en la OA ya que pueden ser fuente de dolor y pérdida de función. Sin embargo, también pueden aparecer sin causar efectos negativos o incluso tener un efecto positivo aumentando la superficie articular (van der Kraan and van den Berg, 2007)

Los osteofitos se forman desde progenitores presentes en el periostio y la membrana sinovial cuando son estimuladas para que proliferen. Durante su desarrollo, el osteofito permanece cubierto con una capa de células similares a fibroblastos. Las células en esta capa contribuyen al crecimiento del osteofito por la proliferación y la diferenciación de los condrocitos dentro de la misma. Así, las células dentro del osteofito en desarrollo sufren condrogénesis y depositan en el tejido moléculas de la matriz, tales como agregano. Los condrocitos más centrales se diferencian aún más y se hipertrofian. Seguidamente, se produce una osificación endocondral, deposición

de hueso y formación de cavidades medulares. El osteofito totalmente desarrollado se integra con el hueso subcondral original pero todavía muestra una capa fibrosa exterior. Finalmente la parte superior de los osteofitos queda cubierta de cartílago ampliando de esta forma la superficie del cartílago original de la articulación (van der Kraan and van den Berg, 2007). Por este motivo, los osteofitos maduros son muy difíciles de identificar y no existen métodos sencillos estandarizados para su detección y cuantificación (Junker et al., 2015; Saha et al., 2011).

Los factores que estimulan la formación de osteofitos son tanto mecánicos como bioquímicos, entre los últimos destaca TGF $\beta$  aunque otras proteínas como BMP2, BMP9 o IGF1 han sido relacionadas con este proceso (van der Kraan and van den Berg, 2007)

### 1.2.3 El hueso subcondral

El hueso subcondral se define como el componente óseo distal al cartílago calcificado. Está separado del cartílago calcificado por la llamada línea de cemento y se compone de dos entidades anatómicas, la placa subcondral formada por una delgada lamela cortical y el hueso cortical trabecular subyacente que se integran en una unidad funcional biomecánica, altamente compleja, que permite un correcto funcionamiento durante el reposo y el movimiento articular (Sanchez et al., 2005). La placa subcondral es porosa y cuenta con canales de comunicación con el cartílago calcificado especialmente en las zonas sometidas a más estrés. De ella deriva el hueso cortical subcondral que es la estructura responsable de absorber y distribuir la carga a la que es sometida la articulación. Además, al ser una estructura muy porosa, rica vasos, que contiene medula ósea y metabólicamente activa tiene una función de aporte de nutrientes al cartílago pudiendo ser responsable de hasta un 50% del aporte de glucosa y oxígeno al cartílago (Imhof et al., 2000).

El hueso subcondral y el cartílago calcificado forman una unidad estructural denominada unión osteocondral. Una excesiva rigidez y pérdida de flexibilidad del hueso subcondral puede transmitir cargas mayores y provocar un daño en el cartílago, a su vez las lesiones en el cartílago aumentarán la carga que soporta el hueso subcondral. Además de la comunicación mediante fuerzas mecánicas existe también una comunicación a nivel molecular ya que se ha demostrado varios factores liberados por células óseas pueden alcanzar el cartílago y viceversa (Martínez-Calatrava et al., 2012).

El hueso subcondral tiene un papel fundamental en el desarrollo de la OA y sufre diversos cambios estructurales e histopatológicos como quistes, lesiones de la medula ósea, microfisuras y esclerosis del hueso subcondral caracterizado por el engrosamiento trabecular, aumento de



volumen de osteoide y disminución de calcio asociado a fibras de colágenos durante la evolución de la patología (Henrotin et al., 2012).

Sin embargo, en diferentes estadios de OA podrían aparecer otras alteraciones estructurales. Durante la OA temprana se ha descrito un incremento del remodelado óseo y pérdida de hueso subcondral. Además, nuestro grupo ha demostrado que un incremento de la tasa de remodelado subcondral, con pérdida de masa ósea, está asociado con mayor daño en el cartílago en conejos con OA (Martínez-Calatrava et al., 2012; Moreno-Rubio et al., 2010). Esta pérdida de hueso subcondral se ha observado también en diversos modelos animales que han mostrado un aumento de la separación trabecular una disminución de la fracción de volumen que ocupa el hueso y el espesor trabecular asociado un deterioro del cartílago (Li et al., 2013).

También en etapas avanzadas de OA, existe controversia respecto a la aparición de esclerosis subcondral, puesto que, en un estudio que utilizó imágenes por resonancia magnética nuclear de 3T, se encontró que, en las zonas adyacentes a las lesiones del cartílago medial en la tibia había una mayor fracción de volumen de hueso y un mayor espesor trabecular. Por el contrario, en los compartimentos laterales de la articulación se producía el efecto contrario. Es decir, mientras que en las zonas donde el cartílago estaba dañado aparecía esclerosis del hueso subcondral, las zonas adyacentes presentaban osteopenia (Chiba et al., 2012).

#### *1.2.3.1 Sistema OPG/RANK-L*

En el remodelado de hueso subcondral, tiene especial relevancia la ruta que implica al receptor activador de NF $\kappa$ B (RANK), a su ligando (RANK-L) y a la osteoprotegerina (OPG). Estos mediadores regulan la diferenciación y la actividad de los osteoclastos y han demostrado ser importantes en la destrucción ósea en otras patologías articulares, como la artritis reumatoide (Goldring and Marcu, 2009). La unión de RANK, el cual se expresa en la superficie de células precursoras de osteoclastos, a RANK-L producido por osteoblastos u otras células, promueve la maduración de osteoclastos. OPG, que igual que RANK-L se expresa en diversos tipos celulares, actúa a su vez inhibiendo este proceso, puesto que, se une a RANK-L secuestrándolo e impidiendo que se produzca la unión RANK/RANK-L. Así el ratio OPG/RANK-L es un indicativo de resorción ósea y juega un papel crucial en la fisiopatología del hueso.

Estos mediadores, además de en el hueso, se expresan también en condrocitos, pero hasta el momento no se ha identificado ninguna función específica de RANK-L u OPG en el cartílago articular. Algunos autores han sugerido que los condrocitos hipertróficos de la placa de crecimiento participan en la diferenciación de precursores de osteoclastos debido a que expresan RANK-L en mayor medida que OPG modificando su equilibrio en favor de la

osteoclastogenesis (Boyce and Xing, 2008). Además un trabajo publicado por nuestro laboratorio, demostró que el RANK-L sintetizado por los condrocitos, podría contribuir a la osteoporosis juxta-articular asociada a la artritis crónica mediante un incremento de la osteoclastogenesis en el hueso subcondral (Martínez-Calatrava et al., 2012).

#### 1.2.4 La membrana sinovial

La membrana sinovial es un tejido blando que recubre las cavidades de las articulaciones diartrodiales, la cubierta de tendones y bursas (sacos llenos de líquido localizados entre tendones y huesos).

Está formada por una capa íntima que está en contacto directo con la articulación y una capa subyacente denominada subíntima. La íntima está formada por una capa de 1 a 3 células de espesor que pueden ser de naturaleza macrofágica, derivados de monocitos sanguíneos (sinoviocitos tipo A), y fibroblastos especializados de origen local (sinoviocitos tipo B). La capa subíntima varía según el tipo de sinovial, pero contiene vasos linfáticos y sanguíneos, fibroblastos residentes, células infiltradas embebidas en una matriz compuesta por colágenos.

Se ha descrito que existen tres tipos de membrana sinovial (Smith, 2011). La sinovia fibrosa está formada por un tejido fibroso, como ligamentos o tendones, sobre los que aparece una capa íntima más o menos continua. La sinovia areolar se caracteriza por una capa íntima superficial más o menos continua bajo la cual aparece una red de capilares sanguíneos seguida de un plexo de arteriolas y vénulas. Finalmente, la sinovia adiposa presenta una capa íntima completa con una red de capilares superficial, la matriz suele ser rica en colágenos y la parte más profunda del tejido está formada por tejido adiposo.

La principal función de la membrana sinovial es la de producir líquido sinovial. Éste, contiene moléculas de alto peso molecular que permiten el deslizamiento de las superficies, impidiendo la adhesión de las distintas estructuras y tejidos y evitando el desgaste del cartílago. También es responsable de proporcionar nutrientes al cartílago, los cuales difunden desde la superficie articular hasta las capas más profundas de la matriz cartilaginosa. Además, la sinovial adiposa podría tener una función de amortiguación y de reparto de fuerzas en la articulación, tal como se ha sugerido en el caso de la almohadilla adiposa infrapatelar (Eymard and Chevalier, 2016).

Se ha descrito que al menos el 50% de los pacientes con OA sufren inflamación de la membrana sinovial o sinovitis. No obstante, actualmente se cree que este porcentaje puede ser mayor ya que estudios que han empleado técnicas de imagen avanzadas han observado sinovitis en un 70% de los pacientes estudiados (Scanzello and Goldring, 2012).

La sinovitis artrósica se caracteriza por la transformación agresiva del fenotipo de los sinoviocitos B y por el desarrollo de un infiltrado inflamatorio, proliferación de la capa íntima, formación de tejido fibroso y neovascularización que en los casos más graves resulta en una hiperplasia sinovial persistente capaz de destruir el cartílago articular y producir erosiones óseas.

El estudio del papel que juega la inflamación de la membrana sinovial o sinovitis en el desarrollo de la OA es relativamente reciente, puesto que históricamente la OA se había descrito como una artritis no inflamatoria (Berenbaum, 2013). Sin embargo, se ha descrito que conduce a una pérdida de función por un aumento de la permeabilidad de la membrana sinovial que permite la difusión de moléculas del líquido sinovial al torrente sanguíneo y viceversa (Scanzello and Goldring, 2012) . Se ha evidenciado que, influye además en la aparición de síntomas, puede ser fuente de dolor en la articulación, la fibrosis característica puede provocar rigidez en la articulación, y podría participar en la formación de osteofitos (Wei and Bai, 2016). Incluso se ha postulado que la sinovitis podría preceder o incrementar el riesgo de sufrir OA (Atukorala et al., 2016; Hügler and Geurts)

### 1.3 Heterogeneidad y factores de riesgo para la OA

El principal factor de riesgo que se asocia a la OA es la edad. Sin embargo, la OA se puede clasificar en varios fenotipos según los factores de riesgo a los que se asocia. Así se pueden distinguir la OA primaria o secundaria (dependiendo si es causada por una lesión previa), la asociada a la edad, a los factores genéticos, hormonales o la OA metabólica entre otros (Castañeda et al., 2013; Herrero-Beaumont et al., 2009; Zhuo et al., 2012).

La OA metabólica es considerada el segundo fenotipo más frecuente detrás de la asociada a la edad (Le Clanche et al., 2016) lo que se refleja en algunos estudios que apuntan a una asociación entre la OA y los eventos cardiovasculares (Haugen et al., 2015). Los factores de riesgo para la OA metabólica están siendo intensamente investigados por la comunidad científica, puesto son cada vez más prevalentes en nuestra sociedad (Li et al., 2016). Así, son una diana importante para reducir el coste socio-económico que supondrá la OA en el futuro. Sin embargo, todavía no se conoce bien que características de la OA se ven más afectadas por las distintas patologías metabólicas a las cuales se ha asociado.

#### 1.4 Consecuencias de alteraciones metabólicas en el desarrollo de la OA y sus mecanismos

Numerosos trabajos han estudiado la relación de distintos desordenes metabólicos como la diabetes, la dislipemia, la obesidad o el MetS con la OA y empieza a establecerse la idea de que la investigación en esta área puede ser muy importante para el desarrollo de nuevas terapias para los pacientes que sufren un fenotipo de OA metabólica. Se calcula que aproximadamente la mitad de los enfermos podrían tener un fenotipo metabólico de OA, que afecta principalmente a la población de mediana edad (de entre 45 y 65 años) y muestran una evolución y progresión más rápida asociada a un mayor grado de dolor (Le Clanche et al., 2016)

No obstante, no está claro cómo afecta cada uno de los distintos trastornos metabólicos a la articulación. Trabajos realizados en pacientes que sufren MetS, una patología que se produce como consecuencia de sufrir diversas alteraciones metabólicas entre las que se incluyen la hipertensión arterial, elevada concentración de glucosa en sangre, dislipemia y un exceso de grasa abdominal, indican que la asociación que presenta esta patología con la OA es mayor cuanto más componentes de este síndrome muestren los pacientes (Monira Hussain et al., 2014). Es decir, una alteración en el metabolismo de la glucosa, la desregulación de lípidos o la hipertensión tienen efectos aditivos. Aunque recientemente se han publicado varios trabajos que plantean nuevas teorías sobre el papel de las condiciones que componen el MetS en el desarrollo de la OA (Le Clanche et al., 2016; Zhuo et al., 2012), la aportación de estas condiciones de manera independiente sigue siendo en gran medida desconocida.

A continuación, se presenta un análisis de cómo la diabetes y las alteraciones del metabolismo de los lípidos se asocian a la OA y cuáles son los mecanismos implicados que se han propuesto hasta la fecha.

##### 1.4.1 Asociación entre la diabetes Mellitus y la OA

La diabetes Mellitus (DM) es una patología causada por alteraciones metabólicas producidas como resultado de la disfuncionalidad de los mecanismos responsables del manejo de la glucosa en el organismo. Existen dos tipos de DM, la DM de tipo 1 se caracteriza por una disminución en la producción de insulina responsable de regular el metabolismo de la glucosa. La DM de tipo 2 implica una resistencia a insulina a nivel celular y se produce típicamente como consecuencia de hábitos alimentarios poco saludables. En ambos, la reducción en la actividad de la insulina provoca una hiperglucemia sostenida en el tiempo que a su vez provoca daños en el organismo. Se estima que en el año 2035, 592 millones de personas adultas sufrirán diabetes (King and Rosenthal, 2015).

El primer estudio que sugería la existencia de una relación entre la DM y la OA se publicó en 1961 (Sellam and Berenbaum, 2013). Estas dos patologías comparten características epidemiológicas puesto que ambas son enfermedades complejas con una considerable heterogeneidad clínica y etiologías multifactoriales que involucran interacciones entre factores genéticos y ambientales. Comparten además factores de riesgo como la edad o desórdenes metabólicos. Más aun, los estudios poblacionales, transversales Chingford, Rotterdam, ROAD y otros, realizados en distintas poblaciones de Estados Unidos, Italia o Puerto Rico (Dahaghin et al., 2007; Hart et al., 1995; King et al., 2013; Nieves-Plaza et al., 2013; Schett et al., 2013; Yoshimura et al., 2015) concluyeron que la DM es significativamente más común en pacientes con OA. En contraposición, en otros trabajos no se encontró dicha asociación (Frey et al., 1996; Garesius et al.). Los diferentes criterios de selección de los pacientes y los diferentes estilos de vida de las cohortes seleccionadas podrían ser las responsables de dichas discrepancias.

Existen además algunos trabajos en los que se ha observado que características específicas de la OA, como una mayor degeneración del cartílago o un mayor estrechamiento de la cavidad articular, podrían verse agravadas en pacientes con DM (Eymard et al., 2015; Gibson et al., 2012; Jungmann et al., 2013). La matriz extracelular del cartílago, sufriría cambios ante alteraciones metabólicas asociadas a la DM como una disminución en la producción de colágenos y un incremento en el catabolismo de proteoglicanos (Silberberg et al., 1977; Umpierrez et al., 1989). Asimismo los pacientes que presentan DM además de OA, tendrían un mayor riesgo de ser sometidos a una artroplastía y de seguir sufriendo dolor después de la intervención (King et al., 2013; Rajamäki et al., 2015; Schett et al., 2013)

Adicionalmente a los estudios en humanos también se han desarrollado modelos animales en los que se han podido observar cambios en la OA de animales con DM. Sin embargo estos modelos tienen importantes limitaciones, ya que hasta el momento ninguno ha conseguido reproducir fielmente la diabetes de tipo 1 o de tipo 2, ya que en su mayoría, adquieren características de ambos tipos (King and Rosenthal, 2015).

En estos modelos animales se han observado cambios significativos en distintos tejidos articulares que podrían causar un mayor daño y una OA más grave, como consecuencia de la DM. Existen evidencias de que las anomalías en los huesos provocados por la DM, podrían conducir a una deficiencia en la reparación de microfracturas en el hueso (Li et al., 2013). Esto afectaría su biomecánica promoviendo la aparición de la OA, y se asociaría a una peor recuperación tras la artroplastía. También se ha observado que la membrana sinovial de ratas

con DM tipo 1 sufre fibrosis como consecuencia de un incremento de COL1, COL2, y COL5 (Atayde et al., 2012), lo que podría conducir a un agravamiento de la OA.

A pesar de los diversos estudios poblacionales y algunos modelos animales que apuntan a la DM como un factor de riesgo para la OA, los mecanismos moleculares que asocian estas patologías no están bien definidos.

La inflamación sistémica asociada a la diabetes es el mecanismo más estudiado como nexo de unión entre estas dos condiciones puesto que se ha demostrado que la OA tiene una importante componente inflamatoria. La sinovitis, el estrechamiento articular o la aparición de osteofitos podría verse agravados como consecuencia del incremento de proteínas proinflamatorias sobreexpresadas a causa de la DM.

También la alteración en el metabolismo de la glucosa podría ser un importante mediador en el daño articular, y podría contribuir a la patogenia común. No obstante, se conoce muy poco acerca del efecto de concentraciones variables de glucosa en la articulación y el cartílago.

#### *1.4.1.1 Papel de la hiperglucemia en la OA*

La hiperglucemia, podría causar daños en la articulación a través de distintas vías, mediante un incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno y citoquinas proinflamatorias contribuyendo estrés oxidativo y al daño tisular (Laiguillon et al., 2015). Esto se agrava debido a que la absorción de glucosa de las células es estimulada por citoquinas catabólicas presentes en la articulación en la OA (Hernvann et al., 1992). En la OA los efectos de una elevada concentración de glucosa se han estudiado sobre todo en el cartílago y los condrocitos y se ha hipotetizado que los condrocitos podrían verse afectados a distintos niveles, como por una peor regulación del transporte de glucosa, un incremento de productos de glicación avanzada o el incremento de proteínas que son modificadas postraduccionalmente mediante O-N-AcetilGlicosilación (O-GlcNAc), (Mobasheri, 2012; Rosa et al., 2009; Tardio et al., 2011).

Los condrocitos son células sensibles a cambios en la concentración de glucosa, ya que son capaces de detectar y adaptarse a las variaciones en la concentración extracelular. Sin embargo, se ha demostrado que los condrocitos OA en cultivo ante elevadas concentraciones de glucosa, no son capaces de disminuir la expresión del transportados de glucosa GLUT-1 ni de reducir su actividad (Rosa et al., 2009) como consecuencia se produce un mayor estrés oxidativo y se favorece la producción de mediadores catabólicos como la MMP-13 (Rosa et al., 2011).

Las elevadas concentraciones de glucosa podrían también incidir en la OA mediante los llamados productos de glicación avanzada (AGEs), moléculas que sufren una adición de una molécula de

azúcar de forma no enzimática. Las AGEs han demostrado estas incrementados de forma sistémica en pacientes diabéticos y también en el cartílago articular (Rosenbloom and Silverstein, 1996; Stefano et al., 2016), de hecho la determinación de la hemoglobina glicada, uno de los AGEs más estudiados, en suero se utiliza en la práctica clínica para estudiar el manejo de la glucosa de los pacientes.. Los AGEs pueden causar daño tisular en el cartílago causando rigidez y pérdida de sus funciones biomecánicas tanto de forma directa provocando entrecruzamientos de los colágenos, como mediante la interacción con su receptor (RAGE) incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno y activando rutas proinflamatorias que causan una sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas o marcadores de apoptosis (DeGroot et al., 2001; Pertynska-Marczewska et al., 2015).

Otro de los mecanismos comunes entre la diabetes y la OA es el incremento de proteínas O-GlcNAc. Estas proteínas han sido muy estudiadas en relación a diabetes, se ha demostrado que en los pacientes con DM estas proteínas están incrementadas en diversos tipos celulares (Slawson et al., 2010) y se considera un importante efector en la enfermedad. Asimismo, en trabajos previos realizados por nuestro laboratorio, hemos observado que en el cartílago de pacientes OA, las proteínas O-GlcNAc están sobreexpresadas respecto al cartílago de sujetos sanos (Tardio et al., 2011). En línea con estos datos, hemos demostrado que *in-vitro* la diferenciación de la línea celular de condrocitos prehipertrofos ATDC5, está precedida por un aumento de proteínas O-GlcNAc. Además descubrimos que un aumento de proteínas O-GlcNAc es suficiente y necesario para que los condrocitos adquieran este fenotipo hipertrófico (Andrés-Bergós et al., 2012) por lo que la O-GlcNAc proteica podría participar en la aparición del fenotipo de tipo hipertrófico en cartílago de pacientes OA.

#### *1.4.1.1.1 La O-GlcNAc proteica*

En los últimos años, varios autores han estudiado el papel de la O-GlcNAc en diversas patologías. Algunos estudios sugieren que un incremento agudo en la cantidad de proteínas O-GlcNAc sería un mecanismo protector para la célula en situaciones de estrés (Taylor et al., 2008; Zachara and Hart, 2004). Por ejemplo, el incremento en los niveles de O-GlcNAc tras la isquemia cardiaca se correlaciona con una mejor recuperación funcional. En contraste con el beneficio asociado a elevaciones transitorias, alteraciones crónicas en los niveles de O-GlcNAc se han asociado con la patogénesis de enfermedades degenerativas además de la OA y la DM como el Alzheimer, otras enfermedades neurodegenerativas o el cáncer. Un incremento de estas proteínas también se ha asociado al envejecimiento (Issad, 2010; Nagel and Ball, 2015)

La O-GlcNAc proteica es una de las modificaciones postraduccionales (MPT) más importantes de la célula. Esto se refleja en la alta tasa de conservación que muestra, estando presente en los organismos más simples como virus hasta en las más complejas como plantas o animales (Lefebvre and Issad, 2015). Desde que se descubrió en 1984 se han identificado más 4000 proteínas O-GlcNAcadas (Bond and Hanover, 2015). Esta MPT consiste en la incorporación de una única molécula de N-acetylglucosamina O-ligada (O-GlcNAc) a los residuos serina y treonina de las proteínas del citosol, núcleo y mitocondria. Al contrario que otros tipos de glicosilación 'tradicional', este residuo no se incorpora en retículo endoplasmático o el aparato de Golgi, ni se alarga incorporando estructuras más complejas.

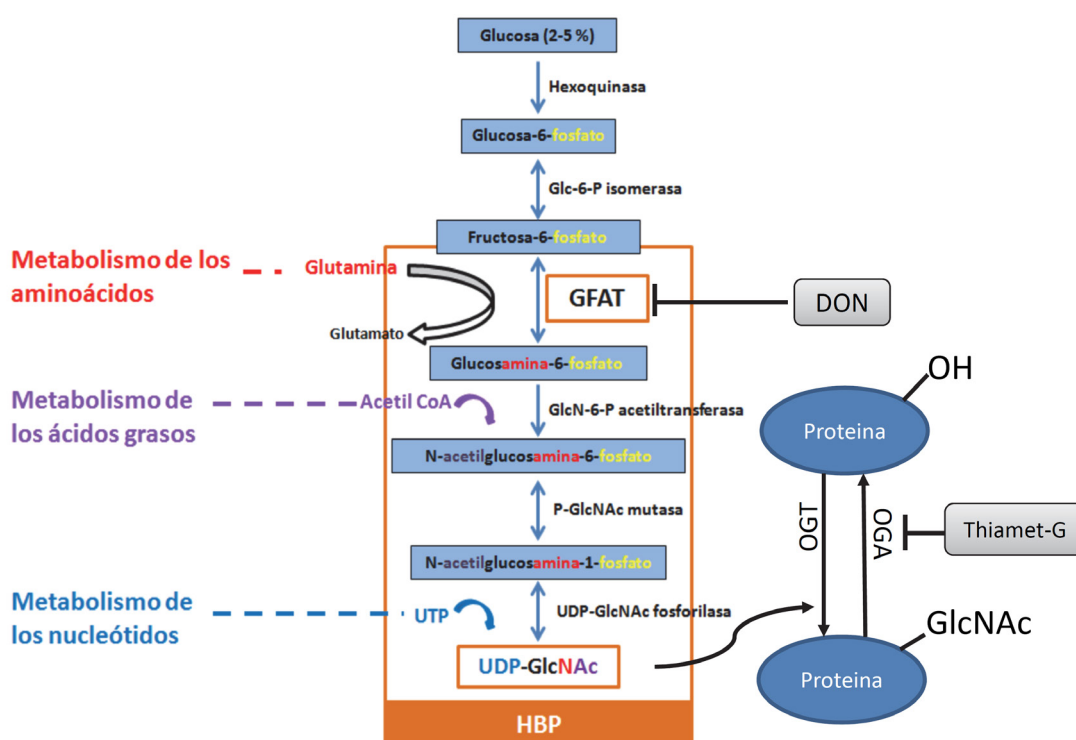


Figura 2. Ruta de biosíntesis de hexosaminas

La O-GlcNAcación es una MPT reversible mediante la acción de las enzimas O-GlcNAc transferasa (OGT) que cataliza la incorporación del residuo a la proteína y la O-GlcNAcase (OGA) que hidroliza la unión al residuo. Esta propiedad permite que, al igual que la fosforilación, la incorporación de O-GlcNAc pueda regular la función, estabilidad o localización proteica.

El residuo O-GlcNAc de las proteínas proviene de la molécula UDP-GlcNAc que es a su vez el producto final de la ruta de las hexosaminas. Esta ruta es altamente dependiente del estado nutricional de la célula puesto que entre un 2 y un 5% de la glucosa que entra en la célula es



metabolizada por esta vía. Además el metabolismo de aminoácidos, ácidos grasos o nucleótidos también regulan esta vía (Nagel and Ball, 2015). Debido a la fuerte regulación que ejerce el estado metabólico sobre esta ruta, se ha propuesto que la O-GlcNAción podría actuar como sensor nutricional y podría ser un mediador importante en la asociación de la diabetes con la OA.

#### 1.4.2 Asociación de las alteraciones del metabolismo lipídico con la OA

La alteración del metabolismo lipídico ha sido asociada con la OA (Chadha, 2016), sin embargo los mecanismos por los cuales actúan no están bien definidos hasta el momento, por lo que un mayor conocimiento al respecto representa una interesante oportunidad para el desarrollo de nuevas terapias. En los últimos años está ganando protagonismo el estudio general de las fracciones lipídicas circulantes o dislipemias, así como el estudio de los distintos factores secretados por el tejido adiposo o adipoquinas.

##### 1.4.2.1 *Papel de la obesidad en el desarrollo de la OA*

La obesidad se define como una acumulación excesiva de grasa en el organismo y se puede cuantificar mediante el índice de masa corporal (IMC), un indicador de la relación entre la altura y el peso que se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Así, según el OMS un IMC igual o superior a 30 es determinante de obesidad. Es además cada vez más prevalente, el OMS estableció en 2014 que alrededor del 13% de la población adulta mundial (un 11% de los hombres y un 15% de las mujeres) eran obesos, cifra que se ha multiplicado entre 1980 y 2014.

La relación entre la obesidad y la OA se ha atribuido principalmente al excesivo incremento de carga mecánica que soportan las articulaciones de estos pacientes. Sin embargo, trabajos más recientes indican que la OA también está incrementada en articulaciones que no sufren carga, como las manos (Dahaghin et al., 2007), lo que implica que además de la carga mecánica otros factores inducidos por la obesidad juegan un papel importante en el desarrollo de la OA.

También en modelos animales, se ha confirmado que las alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad tienen un efecto deletéreo sobre el deterioro del cartílago y la OA siendo este efecto superior al del sobrepeso. Los trabajos más recientes asocian este hecho con una disregulación de adipoquinas (Honsawek and Chayanupatkul, 2010; Scotece and Mobasher, 2015). Sin embargo, el exceso de grasa acumulada provoca otras comorbilidades como la dislipemia, la diabetes o un incremento en el estrés oxidativo, que hacen difícil aislar los factores responsables del agravamiento de la OA en pacientes obesos.

#### 1.4.2.1.1 *Papel de la hipercolesterolemia en el desarrollo de la OA*

Uno de los desórdenes metabólicos más estrechamente relacionados con la obesidad es la dislipemia que conlleva un aumento de las fracciones lipídicas circulantes o hiperlipidemia. Se caracteriza por una elevación plasmática de colesterol, triglicéridos o ambos.

El colesterol es insoluble en los medios acuosos como la sangre, por lo que se transporta en lipoproteínas, constituidas por una parte lipídica y otra proteica. Existen diferentes tipos de lipoproteínas que transportan el colesterol en la sangre. Las medidas más utilizadas para el estudio de las dislipemias por su valor para predecir patologías cardiovasculares son la medida de colesterol total en suero, cuyos valores se consideran elevados a partir de 6.5 mmol/L (200mg/dL) o las medidas de las fracciones lipídicas individuales lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL) o triglicéridos.

Las LDL Son las lipoproteínas encargadas de transportar el colesterol a los tejidos para su utilización. La mayor parte del colesterol en sangre es colesterol LDL. Cuando el nivel de LDL en sangre aumenta por encima de los valores considerados normales también incrementa el riesgo de sufrir patologías cardiovasculares.

Las HDL son las lipoproteínas que recogen el colesterol de los tejidos y lo transportan al hígado para su eliminación a través de la bilis. A diferencia del colesterol LDL un nivel bajo de colesterol HDL aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular.

A pesar de que las hiperlipidemias pueden tener causas primarias de tipo genético (hipercolesterolemia familiar) las más prevalentes son las secundarias, asociadas a un estilo de vida sedentario y un aporte excesivo de lípidos al organismo o asociada a otras patologías como diabetes, obesidad, hipotiroidismo, algunos trastornos hepáticos o renales etc. Debido al elevado consumo de alimentos ricos en grasas animales o alimentos altamente procesados en los países occidentales, las hipercolesterolemias son muy comunes.

La prevalencia de la hipercolesterolemia varía enormemente entre distintas poblaciones, pero según un estudio llevado a cabo por la OMS un promedio del 27% de los hombres y del 25% de las mujeres de las poblaciones estudiadas sufre hipercolesterolemia (Tolonen et al., 2005)

Los datos del estudio NHANES reflejaron además, que la prevalencia de la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia era mayor en la población que sufre OA (32% y 50% respectivamente) que en la población sin OA (24% y 29,2%) (Puenpatom and Victor, 2009; Singh et al., 2002).

La función del colesterol en el desarrollo de enfermedad de las arterias coronarias, está ampliamente documentado y diversos estudios han demostrado su efecto deletéreo en el

desarrollo de la arterosclerosis (van Rooy and Pretorius, 2014). Pero los primeros estudios que relacionaban la hipercolesterolemia con la OA de manos en mujeres se publicaron en los años sesenta (Kellgren, 1961). Más adelante el estudio Chingford (Hart et al., 1995) asocio la OA de rodilla con la hipercolesterolemia también en mujeres. El estudio Ulm y otros trabajos realizados en distintas cohortes, ampliaron esta asociación a la población general (Al-Arfaj, 2003; Stürmer et al., 1998). Además, es importante destacar que se ha podido demostrar que la hipercolesterolemia está asociada a la OA independientemente del BMI (Sellam and Berenbaum, 2013).

Existen diversos trabajos que intentan explicar la relación entre la hipercolesterolemia y la OA analizando las consecuencias derivadas de los elevados niveles de colesterol en distintos tejidos articulares. El tejido más estudiado es el cartílago, de cuya composición, los lípidos representan un 1%. Son además importantes nutrientes para los condrocitos (Stockwell, 1967) que cuentan con elevados niveles de colesterol en sus membranas celulares y son capaces de sintetizar su propio colesterol así como de expresar diversos receptores responsables de su captación y eflujo (Thijssen et al., 2015)

El cartílago OA sufre una desregulación en la homeostasis de los lípidos que produce una acumulación de ácidos grasos y colesterol especialmente en la zona (Le Clanche et al., 2016) superficial del cartílago (Cillero-Pastor et al., 2012). Además, la acumulación de lípidos se correlaciona positivamente con la severidad de la patología (Lippiello et al., 1991). Esta acumulación anormal en pacientes OA se produce cuando el aporte mediante lipoproteínas excede el eflujo de colesterol celular debido posiblemente a una reducción en la expresión de transportadores como LXR, APOA1 o ABCA1 en los condrocitos.

Sin embargo, si un aporte excesivo de colesterol es capaz de causar un mayor daño en el cartílago, es fuente de debate. Para aclarar esta cuestión se han desarrollado diversos modelos animales con resultados heterogéneos.

Gierman y sus colaboradores mostraron en ratones modificados genéticamente, que una dieta rica en lípidos causaba daño en el cartílago, independientemente al BMI, y que este efecto desaparecía al disminuir los niveles de colesterol en los ratones (Gierman et al., 2012, 2014). En otro trabajo (Triantaphyllidou et al., 2013) desarrollaron un modelo en el que mostraban que los ratones con un defecto de maduración en las HDL desarrollaban lesiones en el cartílago de manera espontánea. En esta línea, recientemente se ha publicado un trabajo (Farnaghi et al., 2016) en el que ratones genéticamente modificados y ratas silvestres hipercolesterolémicas mostraban lesiones más graves que sus respectivos controles tras inducir OA de forma

quirúrgica. Sin embargo, otros trabajos (de Munter et al., 2013, 2016a) no han encontrado diferencias en las lesiones en el cartílago de ratones hipercolesterolémicos silvestres o transgénicos. Incluso se han desarrollado estudios que concluyeron que una dieta rica en lípidos acelera la reparación del cartílago en un modelo de ratón mediante la inducción de mediadores anabólicos (Wei et al., 2016).

Además del cartílago, otros tejidos articulares como la membrana sinovial y el hueso son también susceptibles a sufrir cambios como consecuencia de elevados niveles de colesterol. El daño en estos tejidos ha demostrado ser capaz de inducir un mayor daño en el cartílago (Thijssen et al., 2015). Esto se ha demostrado en varios modelos de ratones hipercolesterolémicos, en los que una dieta rica en lípidos se asocia a sinovitis, hiperplasia de la membrana sinovial infrapatelar, activación de macrófagos en la sinovial y una mayor osteofitosis (Iwata et al., 2013; de Munter et al., 2013, 2016b). Sin embargo, los mecanismos que guían estos procesos no están claros por lo que muchos investigadores siguen trabajando en el campo.

#### *1.4.2.2 Papel de las adipoquinas en la OA*

El tejido adiposo además de ser un órgano que actúa como un reservorio energético es una fuente de diversos péptidos bioactivos denominadas adipoquinas con funciones autocrinas, paracrinas o endocrinas. Las adipoquinas están implicadas en numerosos procesos metabólicos como el control del apetito, el gasto energético, sensibilidad a la insulina, inflamación y función cardiovascular (Flehmig et al., 2014).

La leptina y la adiponectina, son dos de las adipoquinas más estudiadas que han sido implicados en la patogénesis de la OA y podrían actuar como nexo de unión entre los desórdenes metabólicos y la OA (Abella et al., 2014)

Un aporte excesivo de nutrientes o la restricción calórica pueden afectar el perfil secretor de los adipocitos ya que la expresión de adipoquinas se ve afectada tanto por un exceso como por una falta de tejido adiposo (Deng and Scherer, 2010). Asimismo, las adipoquinas señalizan el estado funcional del tejido adiposo a distintos tejidos en órganos como el cerebro, el páncreas, el hígado, el sistema inmunitario, el músculo o la vasculatura entre otros. Por ello se está estudiando como contribuyen al desarrollo de diversas patologías asociadas a la obesidad y son candidatos prometedores para nuevas estrategias de tratamiento farmacológico y como herramientas de diagnóstico (Fasshauer and Blüher, 2015). En la OA de rodilla se ha identificado la almohadilla adiposa infrapatelar o cuerpo de Hoffa como una potencial fuente de adipoquinas que podrían afectar a la patología. Ya que en pacientes OA puede adquirir un fenotipo

proinflamatorio y producir adipoquinas o citoquinas que aceleren la progresión de la patología (Conde et al., 2014).

#### *1.4.2.2.1 Adiponectina*

La adiponectina es una proteína que se sintetiza principalmente en el tejido adiposo que tiene una función en la homeostasis de glucosa y lípidos del organismo (Meier and Gressner, 2004). Los niveles circulantes tienden a ser bajos en pacientes obesos y se incrementan con la pérdida de peso. Además, niveles bajos de adiponectina circulante también se asocian a la dislipidemia, incluso en ausencia de otros factores de riesgo de MetS (Trujillo and Scherer, 2006)

El papel de la adiponectina en la OA es controvertido. Algunos trabajos han concluido que los niveles séricos de adiponectina son significativamente mayores en pacientes con OA que en controles sanos (Filková et al., 2009; Laurberg et al., 2009) y se correlacionan con la gravedad de la enfermedad (Koskinen et al., 2011). Además, existen múltiples evidencias de que la adiponectina actúa como factor proinflamatorio en las articulaciones causando efectos adversos en condrocitos y fibroblastos sinoviales induciendo la degeneración del cartílago característica de la OA (de Boer et al., 2012).

Sin embargo, otros estudios revelaron que la disminución de adiponectina en plasma y líquido sinovial se asociaba a un incremento de OA y que existe una correlación inversa entre la adiponectina y la gravedad de la enfermedad (Giaginis et al., 2012)

Estos resultados contradictorios podrían explicarse por diferencias en las características de los pacientes y en los protocolos del estudio. Pero también es posible que la importancia de la adiponectina varíe de acuerdo con la fase y la gravedad del proceso de OA.

#### *1.4.2.2.2 Leptina*

Es una proteína que se sintetizan principalmente los adipocitos cuyos niveles en sangre se correlacionan con la BMI, aunque también es regulado por mediadores proinflamatorios (Gualillo et al., 2000). La leptina ha mostrado además una correlación positiva significativa con distintos parámetros de resistencia a la insulina, con triglicéridos y una correlación negativa con el colesterol HDL (Yadav et al., 2011).

El patrón de expresión de la leptina se ha relacionado con el grado de destrucción del cartílago (Dumond et al., 2004), observando los niveles más altos de leptina en las etapas avanzadas de la enfermedad que se correlacionan además con el grado de dolor (Ku et al., 2009; Lübbecke et al., 2013; Simopoulou et al., 2007). La leptina ha demostrado también ser necesaria para el

desarrollo y progresión de la OA asociada con la obesidad en ratones (Griffin et al., 2009), sugiriendo que la obesidad, per se, no es suficiente para inducir OA.

Recientemente, un estudio mostró que hay una mayor cantidad de leptina la almohadilla de grasa infrapatelar y tejidos sinoviales obtenidos de pacientes con OA en comparación con controles sanos (Conde et al., 2014). Además, los condrocitos del cartílago humano OA muy dañado producen más leptina que los del cartílago normal o con daños leves (Simopoulou et al., 2007). Los distintos trabajos sugieren que la leptina tiene un rol proinflamatorio en la OA y que está involucrada en los cambios patológicos que sufren los distintos tejidos articulares durante la patología (Hu et al., 2011).

---

## 2 OBJETIVOS

---

Diversos desórdenes metabólicos se han relacionado directamente con el desarrollo la OA, si bien se desconocen los mecanismos que subyacen a dichas asociaciones. En esta tesis doctoral se ha estudiado del papel de la hiperglucemia y la dislipemia en las alteraciones tisulares que ocurren durante la OA. Por tanto, nuestros objetivos fueron:

1. Estudiar el efecto de la concentración elevada de glucosa en el cartílago y el hueso subcondral artrósico. Los objetivos concretos fueron:
  - a. Estudiar, si las alteraciones en el manejo de la glucosa modifica la expresión génica de marcadores de hipertrofia condrocitaria en el cartílago de pacientes artrosicos, en comparación con pacientes sin alteraciones metabólicas identificadas.
  - b. Determinar si una concentración elevada de glucosa modifica la expresión génica de marcadores de hipertrofia en condrocitos humanos artrósicos cultivados en un entorno tridimensional. Estudiaremos además si la O-N-acetil-glicosilación proteica podría ser el mecanismo por el cual se producirían estas modificaciones.
  - c. Estudiar si el incremento en la concentración de glucosa circulante podría modificar la estructura del hueso subcondral en un modelo experimental de diabetes en ratas, en comparación con animales sanos.
  - d. Determinar si la concentración elevada de glucosa es capaz de modificar la síntesis de proteínas reguladoras del metabolismo óseo en condrocitos en cultivo.
2. Analizar el efecto de la hiperlipemia en la alteración del cartílago, el hueso subcondral y la membrana sinovial durante la artrosis. Los objetivos concretos fueron:
  - a. Evaluar el efecto de la administración de una dieta rica en lípidos sobre diferentes parámetros sistémicos en conejos con artrosis en comparación con animales con artrosis que recibieron una dieta estándar.
  - b. Estudiar el efecto de una dieta rica en lípidos sobre el daño histopatológico y la síntesis de diferentes mediadores proinflamatorios y procatabólicos en el cartílago de animales con artrosis, en comparación con los artrósicos que reciben una dieta estándar.
  - c. Evaluar el efecto de una dieta rica en lípidos sobre la densidad mineral ósea del hueso subcondral, así como la aparición de osteofitos articulares, en los conejos con artrosis.
  - d. Estudiar el efecto de una dieta rica en lípidos sobre las alteraciones histopatológicas de la membrana sinovial artrósica, en el modelo experimental en conejos, así como sobre la síntesis de diferentes mediadores proinflamatorios, en la membrana sinovial de estos animales.



---

## 3 MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.1 Estudios en Pacientes

Para la realización de este trabajo se utilizó tejido procedente de pacientes que se sometieron a artroplasia total de rodilla en el servicio de cirugía ortopédica de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid. Todos los donantes, que presentaban evidencias clínicas y radiológicas de OA de acuerdo con los criterios de la Sociedad Americana de Reumatología, dieron su consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el comité ético del IIS-FJD.

Los pacientes fueron caracterizados y clasificados de acuerdo su estado metabólico. Todos los grupos mostraron distribuciones de edad y sexo comparables. Antes de ser sometidos a la intervención, se les tomó la tensión arterial y se analizó el colesterol total, la glucosa basal y la hemoglobina glicada en suero. Para la obtención de suero, la sangre se recolectó en tubos con gel separador con interior de silicona y partículas de sílice para acelerar el proceso de coagulación y prevenir la adherencia de hematíes a la pared (BD Vacutainer SST Advance, BD Diagnostics, Plymouth, UK). Se centrifugaron los tubos a 3000rpm durante 30 minutos y se recogió el sobrenadante (suero) para analizar el perfil metabólico de estos pacientes en laboratorio de Bioquímica Clínica de nuestras instalaciones y mediante el Sistema Advia®2400 (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA).

Durante la intervención se obtuvieron las piezas quirúrgicas correspondiente a la rodilla que se reemplazó, tanto del cóndilo femoral como tibial. Se evaluó macroscópicamente el daño en el cartílago y se recogieron muestras de fracciones dañadas y no dañadas de cartílago del cóndilo femoral y el plato tibial. Una porción del cartílago obtenido se utilizó para cultivo celular de condrocitos, mientras que otra, se congeló en nitrógeno líquido para posteriormente llevar a cabo el protocolo de extracción de proteínas totales y de ARN.

### 3.2 Estudios en animales

Todas las prácticas animales se desarrollaron conforme a las guías del Comité Internacional e Institucional de Investigación Animal de acuerdo con la legislación española vigente (RD1201/2005) y las directrices de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, escritas por los Institutos Nacionales de la Salud (Bethesda, MD, USA).

#### 3.2.1 Desarrollo del modelo combinado de hipercolesterolemia y OA en conejos

Para el estudio del efecto de la hipercolesterolemia en OA, se emplearon conejos adultos machos, de raza Nueva Zelanda, con un peso comprendido entre los 3 y 3,5 kg, suministrados por la Granja San Bernardo (Navarra, España). Las condiciones ambientales y de temperatura se

mantuvieron constantes a lo largo del estudio, y consistieron en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad en jaulas individuales de 50 x 40 x 40 cm. Tras dos semanas de aclimatación con acceso ad libitum a agua y pienso estándar comercial (Panlab®, Barcelona, España), los conejos se separaron aleatoriamente en 4 grupos y se iniciaron los modelos.

El estudio se inició con 40 conejos. Veinte conejos fueron alimentados con pienso estándar y otros veinte con una dieta comercial suplementada con un 0,5% de colesterol y un 4% de aceite de cacahuete (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Alemania). Seis semanas después del inicio del estudio, diez conejos alimentados con dieta estándar y diez conejos alimentados con la dieta enriquecida se sometieron a cirugía en ambas rodillas para inducir una OA experimental, mediante menisectomía parcial de la mitad anterior del menisco medial y sección del ligamento cruzado anterior (ACTL) (Calvo et al., 2007). Por tanto, los cuatro grupos de animales fueron:

- Un grupo control alimentado con dieta regular en el que no se practicó ninguna intervención quirúrgica en adelante 'Control'
- Un grupo alimentado con una dieta rica en lípidos en el que no se practicó ninguna intervención quirúrgica, en adelante 'HFD' (del inglés *High Fat Diet*)
- Un grupo alimentado con dieta regular al que se le indujo una OA experimental, en adelante 'OA' (del inglés *Osteoarthritic*)
- Un grupo alimentado con una dieta rica en lípidos al que se le indujo una OA experimental, en adelante 'OA-HFD'.

Dada la experiencia previa del laboratorio en la inducción de lesión articular mediante ACLT se decidió no incluir un grupo de cirugía simulada para comprobar que la inflamación generada por la cirugía no afectaba al resultado de la lesión articular, puesto que hemos realizado dicha comprobación en ocasiones anteriores.

La cirugía tuvo lugar bajo anestesia general mediante inyección intramuscular de una combinación de 2 mg/Kg de xylacina (Rompun, Bayer) e hidrocloreuro de ketamina (Ketolar, Parque-Davis) en proporción 3:1 (Benito et al., 2000) en condiciones de asepsia. Se realizó profilaxis antibiótica con cefonicid i.m. (100 mg/Kg) (Smith K. Beecham) antes de la cirugía y los siguientes tres días.

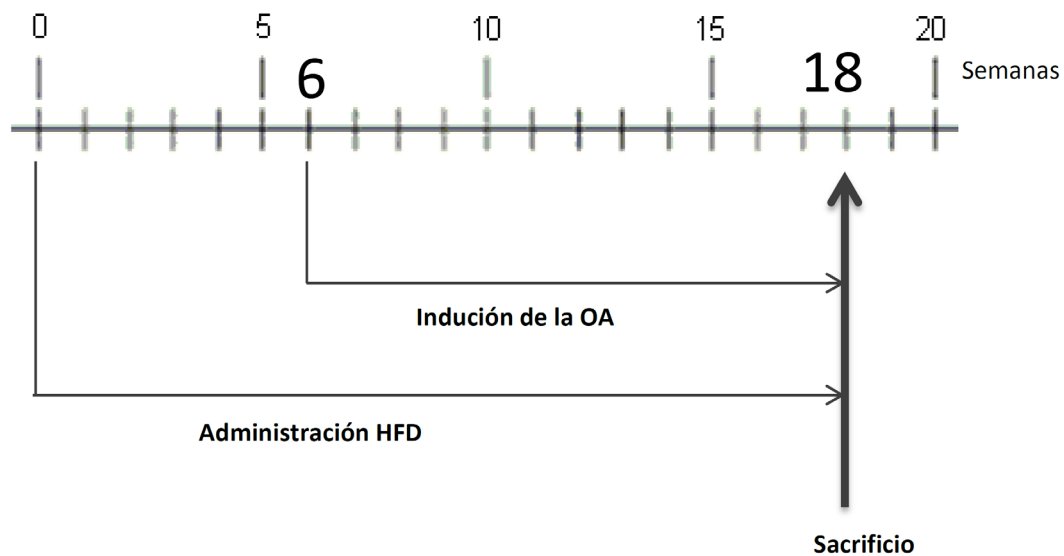


Figura 3. Cronograma descriptivo del modelo combinado de OA y dislipemia en conejos. A los conejos del grupo HFD y OA-HFD se les administro dieta rica en grasa durante las 18 semanas del estudio. La OA se indujo en la semana 6 y se dejó progresar 12 semanas hasta el momento del sacrificio.

La ganancia de peso de los conejos se monitorizo cada dos semanas a lo largo de todo el estudio. En las semanas seis y dieciséis del estudio se tomaron datos de tensión arterial de los conejos con el monitor 'High Definition Oscillometry' y el software 'HDO MDS 2.0' (VET memodiagnostic, Barcelona, España) colocando un manguito específico en una de las patas traseras del animal. No se encontraron diferencias entre los diferentes grupos estudiados a ninguno de los tiempos del estudio.

Una semana antes del sacrificio se sometió a los conejos a un test de tolerancia oral a la glucosa (TTG). Se realizó después de mantener a los conejos en ayunas durante doce horas, administrando 1,5 gramos de glucosa por cada kilo de peso de los conejos, por vía oral, mediante una sonda. Se tomaron muestras de sangre de la arteria central de la oreja en tubos que contenían buffer de citrato de sodio (Vacutainer SST Advance, BD Diagnostics, Plymouth, UK) justo antes de la administración de glucosa y quince, treinta y ciento veinte minutos después. La sangre fue centrifugada para la obtención de plasma y se midieron los niveles de glucosa en el departamento de Bioquímica Clínica del HU-FJD. Para el análisis, se representaron los valores de glucosa en el tiempo y se calculó el área bajo la curva con el programa GraphPad Prism, (GraphPad San Diego California USA).

Doce horas antes del sacrificio se mantuvo a los animales en ayunas, tras lo cual se les extrajo sangre para la obtención de suero y plasma. Para analizar el perfil metabólico de los conejos

estas fracciones se enviaron directamente al laboratorio de Bioquímica Clínica del HU-FJD y mediante el Sistema Advia®2400 se analizaron los niveles de colesterol total, HDL y triglicéridos.

Todos los conejos se sacrificaron a las 18 semanas del inicio del estudio, mediante inyección intracardiaca de Tiobarbital (B. Braun, Barcelona España) 1g/20ml, previa anestesia general descrita anteriormente. Tras el sacrificio se recogieron la membrana sinovial, los cóndilos femorales y el cartílago articular del plato tibial y el hueso subcondral de la tibia de ambas rodillas.

La mitad superior de las sinoviales y el cartílago se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente fueron almacenadas a -80° C hasta su utilización. La mitad inferior de las membranas sinoviales y los cóndilos femorales fueron fijados durante 24 horas en un tampón frío de paraformaldehído al 4%. Después, ambos fémures se descalcificaron durante 4-5 semanas en ácido fórmico 10% y formaldehído 5% para a continuación incluirse en parafina en vista sagital y cortarse a 4 µm de espesor con un microtomo rotatorio (Microm HM325, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Las membranas sinoviales fueron incluidas en parafina en vista transversal, quedando en un lado la capa íntima o interna a la cavidad articular y en el otro la capa más externa, y posteriormente fueron cortadas a 5 µm de espesor.

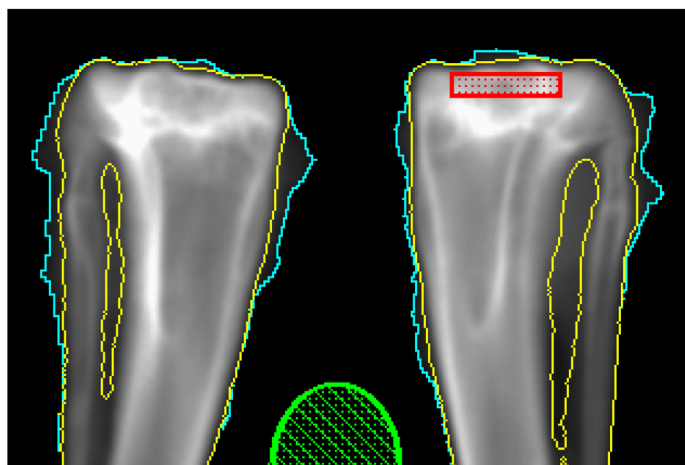


Figura 4. Imagen representativa de una densitometría mediante DEXA de las tibias de conejo. El cuadro rojo representa la región de interés analizada para calcular la DMO en cada grupo.

Los platos tibiales se utilizaron para medir la densidad mineral ósea (DMO) del hueso subcondral. Con este fin, las tibias se escanearon con un densitómetro periférico (GE-Lunar PIXImus versión de software 1.4) que utiliza tecnología de absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA). Después se seleccionó manualmente una región de interés de 9mm x 3mm de la

parte central de la epífisis proximal del hueso subcondral (cuadro rojo en Figura 4), y se calculó la DMO en esta región para ambas rodillas de todos los conejos (Roman-Blas et al., 2017)

### 3.2.2 Estudio del hueso subcondral en un modelo de ratas diabéticas

El estudio del hueso subcondral diabético lo realizamos en colaboración con el laboratorio del Dr. Pedro Esbrit, del IIS-FJD. Con el objetivo de analizar el efecto de la diabetes en el hueso subcondral, analizamos las tibias en un modelo de diabetes en rata. Brevemente, doce ratas de estirpe 'Wistar' macho fueron mantenidas en condiciones ambientales estándares y alimentadas *ad-libitum*. A seis de ellas se les indujo Diabetes Mellitus mediante una administración intraperitoneal, el día de su nacimiento, de estreptozotocina (100ug/g de peso corporal) disuelta en suero salino al 0,9% (Portha et al., 1979). A los cuatro días de esta administración, y de nuevo antes del sacrificio entre los 18 y los 20 meses de edad, se les realizó un TTG. Todas las ratas que habían sido tratadas con estreptozotocina mostraron unos niveles de glucosa por debajo de  $2.5 \times 10^{-2}$ /min, así como niveles bajos de insulina, en comparación con las ratas sin tratar. Al sacrificio se les extrajeron las tibias y se conservaron en etanol hasta su análisis. Al final del estudio, todas las ratas tenían la misma edad y un peso comparable.

Las tibias fueron analizadas con el instrumento de micro tomografía computarizada ( $\mu$ CT) GE eXplore Locus  $\mu$ CT (GE Healthcare, London, Canada). La adquisición de las imágenes se realizó a 80kV y 450 $\mu$ A recogiendo 400 proyecciones en una rotación completa del soporte. Los datos fueron reconstruidos utilizando un algoritmo filtrado de retroproyección para una imagen final de una resolución de 93  $\mu$ m en las tres dimensiones. Las imágenes reconstruidas del hueso subcondral se analizaron con el 'MicroView' software, version 2.2 con 'Advanced Bone Analysis plus' (GE Healthcare)

Debido al carácter mixto del hueso subcondral, que incluye zonas de hueso trabecular y cortical, estudiamos exclusivamente la fracción de volumen que ocupa el hueso en el volumen total analizado (BVF, del inglés Bone Volume Fraction) de esta región. Decidimos no analizar más parámetros, diseñados para medir específicamente características de uno u otro tipo de hueso mencionados.

Para calcular la BVF del hueso subcondral de las ratas se seleccionó manualmente una región de interés que abarcaba la parte central de la meseta interna de la epífisis proximal de la tibia. Se seleccionó un tamaño fijo para esta región de interés y se localizó en la misma posición para todos los huesos estudiados tal como indica la región amarilla en la Figura 5

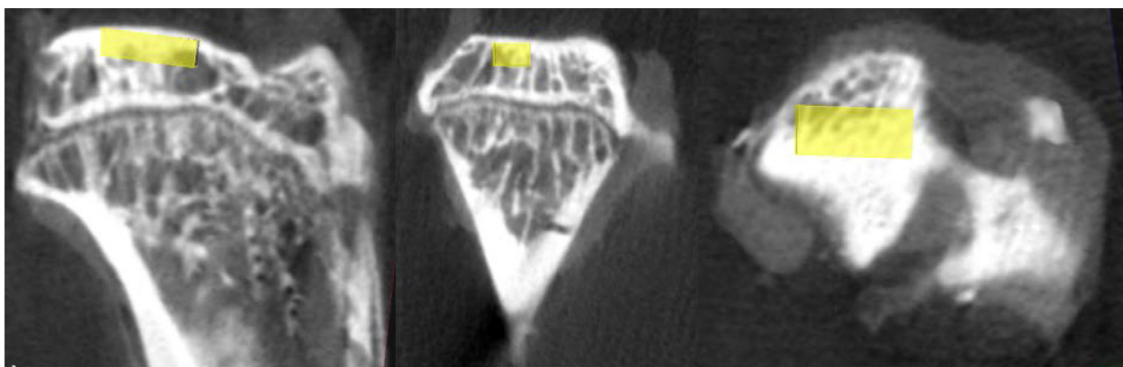


Figura 5 Imagen representativa de las tibias de las ratas tomada mediante  $\mu$ CT. El cuadro amarillo representa en las tres dimensiones, la región de interés analizada para calcular la BVF en cada grupo.

### 3.3 Estudios histopatológicos

Tras desparafinar e hidratar las secciones de fémur de los animales, se tiñeron con azul Alcian/ácido peryódico de Schiff (PAS) para estudiar del cartílago articular. Las muestras fueron evaluadas de forma ciega mediante una versión modificada de la escala propuesta por Mankin ya usada por otros autores (Mankin et al., 1971; Tiraloche et al., 2005) para valorar cartílago artrósico de conejo. Esta versión analiza la tinción de la matriz (0 a 6), la celularidad (0 a 4), la formación de clonas (0 a 3) y la estructura del cartílago articular (0 a 8). Se omitió la puntuación parcial de la integridad de la línea limitante basófila o tidemark por no ser identificada en todos los casos. La puntuación global resultó de la suma de las valoraciones parciales de cada una de las variables analizadas, siendo la puntuación máxima de 21 puntos. Estos mismos cortes se utilizaron para evaluar la presencia de osteofitos que se definieron como como irregularidades en el borde de los huesos que pueden encontrarse rodeados de una estructura cartilaginosa que, a su vez, puede estar rodeada de una capa fibrosa. En la Figura 6 se muestra un ejemplo.

La inflamación sinovial se evaluó de manera ciega en secciones teñidas con hematoxilina y eosina (H-E), previamente desparafinadas e hidratadas, según la escala de Krenn (Krenn et al., 2002, 2006). Se valoró la hiperplasia de la capa íntima, la activación del estroma y el infiltrado inflamatorio del tejido mediante puntuación de 0 a 3, dónde 0 indicaba ausencia, 1 grado leve, 2 intermedio y 3 fuerte. La puntuación total se obtuvo a partir de la suma de los grados parciales con una valoración máxima de 9.

Adicionalmente, en otras secciones de sinovial se realizó la tinción tricrómica de Masson (HT15, Sigma-Aldrich, Inc, UK) para la identificación fibrosis y una mejor caracterización del

estroma sinovial. Esta tinción permite distinguir los colágenos presentes, que se tiñen en verde, de la fracción celular, que se tiñe en rojo.

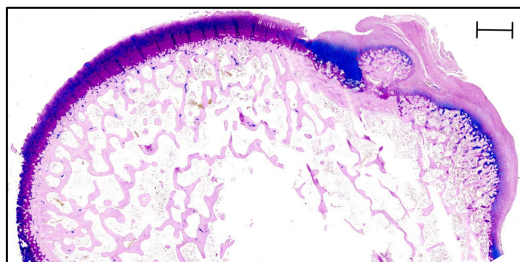


Figura 6. Imagen representativa de los osteofitos que presentan los conejos OA y OA-HFD con una tinción de azul alcian. Se puede observar una protuberancia en el borde del hueso rodeada de una matriz fibrosa y en azul una zona rica en proteoglicanos indicativo de la presencia de condrocitos correspondiente a una fase temprana de formación de osteofito.

Todas las muestras fueron escaneadas con 'Coreo Iscan Au scanner' (Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA). Durante adquisición de la imagen, la presencia de tinción se evaluó en magnificación 4x. A continuación, se utilizaron aumentos 10 o 20x, según las necesidades, para obtener imágenes representativas.

### 3.4 Inmunohistoquímica

Antes de la incubación con anticuerpos primarios, las secciones de tejido incluido en parafina se desparafinaron y se rehidrataron, se inhibió la peroxidasa endógena con una solución 1:1 de metanol y agua oxigenada 3%, y se aplicó la técnica de recuperación termoinducida de epítomos con citrato sódico 10 mM 0,05% Tween20 (MP Biomedicals, Strasbourg, Francia) a pH 6.

Para la identificación de la fracción celular, en secciones de sinovial de los conejos se marcaron macrófagos usando anticuerpo primario monoclonal anti-RAM11 (1/100; Dako, Glostrup, Dinamarca), que se detectó con IgG biotinilada anti-ratón producido en cabra (1/100; Amersham, Arlington Heights, IL, USA) y se visualizó mediante revelado del complejo avidina/biotina unido a enzima peroxidasa (ABC) (VECTASTAIN Elite ABC Kit, Vector laboratorios, California, USA.), usando diaminobenzidina (DAB, Dako, Camarillo, CA, USA) como cromógeno. Los adipocitos vivos se identificaron con inmunotinción de perilipina-1 (PLIN-1) (1/200; Abcam, Cambridge, UK), detectado con IgG anti-cabra producido en burro (1/100; Amersham, Arlington Heights, IL, USA) y visualizado mediante método ABC con DAB.

Finalmente, las preparaciones se contrastaron con hematoxilina, se montaron en medio DPX (VWR International, Bélgica) y se escanearon con 'Coreo Iscan Au scanner' para la posterior



cuantificación). Durante adquisición de la imagen, la presencia de tinción se evaluó en magnificación 4x. A continuación, se utilizaron aumentos 10 o 20x, según las necesidades, para obtener imágenes representativas.

### 3.5 Cuantificación de macrófagos y adipocitos por análisis de imagen.

El análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ de acceso libre (Schindelin et al., 2012). Para calcular el porcentaje de área ocupada por macrófagos se tomaron cinco fotos representativas de cada preparación teñida para RAM11 usando el dispositivo de obtención de microimágenes digitales Leica DMD108 (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA). Después se aisló el color marrón correspondiente al marcaje positivo de RAM11, usando un filtro del *plug-in* 'color-deconvolution' (Ruifrok and Johnston, 2001) y se fijó un mismo límite mínimo de intensidad del color para todas las muestras, se midió la cantidad de color por encima del límite y se calculó el porcentaje de área que ocupaba en la foto. Finalmente se hizo la media de las cinco fotos representativas para cada muestra.

Para calcular el tamaño medio de los adipocitos en las muestras marcadas con perilipina-1, se aprovechó el hecho de que el contenido lipídico de los adipocitos se solubiliza con el xilol usado en el tratamiento de las muestras, por lo que aparecen como células vacías sin tinción, rodeadas de tinción marrón positiva para la perilipina-1 en las inmunohistoquímicas.

Se tomaron cinco fotos representativas de cada preparación y se aplicó una máscara que detecta los bordes de los espacios en blanco de la imagen. Se creó una selección para cada una de ellas y se descartaron manualmente los espacios que no estaban rodeados de marcaje de PLIN-1. Así, se calculó el tamaño medio que tenían los adipocitos en unidades de área para cada muestra.

También, se estudió el porcentaje de área que ocupaba la totalidad de los adipocitos. En este caso se midió el área total que ocupaban las membranas sinoviales en las preparaciones y se comparó con el área que ocupaban el marcaje positivo para PLIN-1 y los espacios en blanco que correspondían a los adipocitos, tal y como se ha descrito anteriormente.

### 3.6 Cultivos de condrocitos en esferas de alginato

Los cultivos de condrocitos se realizaron a partir de la digestión del cartílago que se obtuvo de pacientes. Dado el carácter parcheado del daño articular en la OA, se utilizaron al menos tres porciones diferentes procedentes del cóndilo femoral y del plato tibial de para evitar resultados

sesgados. El cartílago articular se diseccionó en un medio estéril y fue digerido secuencialmente con tripsina (Trypsin-Versene (EDTA) 200 mg/L: Lonza, Walkersville, MD, U.S.A.) durante 15 minutos y con colagenasa tipo IV (Collagenase type IV 1 g/L: Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 5 horas. Las células aisladas se resuspendieron en medio DMEM con 1 g/L de glucosa (Dulbecco Modified Eagle's Medium, Gibco, life technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (STF) (Gibco Gibco, life technologies, Carlsbad, CA, USA) y 60 U/ml de penicilina, 60 µg/ml de estreptomicina. Después se sembraron en placas de 100x20 mm y se incubaron a 37° C en una estufa humidificadora a un 5% de CO<sub>2</sub>. Las células utilizadas en los experimentos constituían una población homogénea de células adheridas y con un fenotipo característico de condrocitos.

Una vez alcanzada la confluencia los condrocitos se levantaron y se cultivaron en tres dimensiones en esferas de alginato para poder extender los tiempos de experimento y mimetizar mejor las condiciones de estas células *in-vivo*. Para ello, cuando los cultivos celulares alcanzaron la confluencia después del primer pase, se lavaron con suero salino y se incubaron 5 min con tripsina a 37°C tras lo cual, se paró la reacción con medio DMEM con 10% de SFT. Con ayuda de un rascador se levantaron las células de la placa y se contaron en una cámara 'Neubauer'. Se recogieron las células mediante centrifugación y se resuspendieron en una solución de alginato (20mM HEPES, 150mM NaCl y 1,2% Ácido Algínico) a pH 7,4 a razón de cuatro millones de células por mililitro. Las células en suspensión se recogieron con la ayuda de una jeringa de un mililitro y se hicieron caer gota a gota a través de aguja a una solución de cloruro de calcio (102mM CaCl<sub>2</sub> y 10mM HEPES) a pH 7,4. Se dejaron polimerizar durante diez minutos en agitación y posteriormente se realizaron 3 lavados con suero salino. Finalmente se depositaron diez esferas por pocillo en placas de 6 pocillos con tres mililitros de medio DMEM de 1g/L glucosa con 60 U/ml de penicilina, 60 µg/ml de estreptomicina, Insulina-Transferrina-Selenito (ITS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) al 1%, 50ug/mL de ácido ascórbico (Sigma, St. Louis, MO, USA) y L-prolina 2mM (Sigma, St. Louis, MO, USA). Antes de iniciar los experimentos, se dejaron dos días con el medio basal ya mencionado para que las células se adaptaran a la nueva condición. Tras este periodo las esferas se expusieron a una concentración de 30mM de glucosa, añadiendo glucosa 24,5 mM al medio de cultivo que contiene 5,4mM, para realizar un estudio de tiempo-respuesta. Una vez seleccionados los 11 días como tiempo óptimo se estimularon las células con 30 mM glucosa, 24,5 mM manitol (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 µM thiamet-G (Thi) (donado por la Dra. Natasha E. Zachara, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA.) 6-diazo-5-oxo-l-norleucina (DON; Sigma, Saint Louis, MO, USA) a una dosis de 10<sup>-5</sup> M. Se cambiaron el medio y los estímulos dos veces por semana durante once días, tras lo cual

se disolvieron las esferas con solución de citrato (55mM citrato de sodio y 150mM NaCl) y se obtuvo un pellet de células mediante centrifugación. Las células se guardaron a -80° C hasta su utilización.

### 3.7 Extracción de proteína y cuantificación

Las muestras de cartílago articular de humanos y de conejos y las membranas sinoviales de los conejos, se pulverizaron mediante homogeneización mecánica en una cámara enfriada previamente con nitrógeno líquido. El homogeneizado se resuspendió en un tampón de lisis frío (15mM HEPES pH 7,3, 10% glicerol, 0,5% Nonidet P-40, 250mM NaCl, 1mM EDTA) que incluía inhibidores de proteasas específicos Phenil-metilsulfonil-fluoride (PMSF) 0,1M, cóctel de inhibidores de proteasas comercial (CIP; Materiales y métodos 34 Sigma, St. Louis, MO, USA) y thi 1µl/ml.

Las proteínas totales de las células en cultivo se extrajeron, tras el lavado con PBS 1M, aplicando directamente sobre las células el tampón de lisis frío especificado anteriormente. En ambos casos, el tampón se dejó actuar durante 15 minutos a 4°C y se centrifugaron las muestras a 12000 r.p.m., 15 minutos a 4°C.

### 3.8 Estudios de síntesis de proteínas

Los estudios de síntesis proteica se realizaron mediante la técnica de Western Blot empleando veinte microgramos de proteína total de cada una de las muestras de extractos de tejido y cultivos celulares. Estas proteínas fueron cargadas en geles SDS-poliacrilamida a una concentración adecuada en función del peso molecular estimado de la proteína a estudiar, y separadas mediante electroforesis. Las proteínas se transfirieron de los geles a membranas de nitrocelulosa, (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), que fueron bloqueadas con leche desnatada al 3% en solución salina tamponada con Tris (TBS del inglés *Tris-buffered saline*) con Tween20 al 0,5% a temperatura ambiente, durante una hora, y después incubada O.N. a 4 °C con anticuerpos anti RL2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) que detecta la modificación O-Glc-Nac de las proteínas, COL-1 (Chemicon, Merck Chemicals and Life Science GesmbH Darmstadt, Alemania) y PLIN-1 diluidos en albumina sérica bovina al 3% en TBS con Tween20 al 0,5%.

A continuación, la unión del anticuerpo se visualizó por quimioluminiscencia utilizando el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y el kit ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Las bandas se cuantificaron por densitometría y los resultados

se expresaron como unidades arbitrarias utilizando el software Quantity One (Version 4.6.3). Para la cuantificación de proteínas O-GlcNAc, se densitómetró el carril completo de cada muestra.

Para el control de carga, las proteínas se tiñeron en los geles de acrilamida con el reactivo EZBlue™ (Sigma, St. Louis, MO, USA), se densitómetró la parte central del carril correspondiente a cada muestra. Los valores obtenidos se utilizaron para normalizar los valores de densitometría obtenidos para cada proteína y muestra. Finalmente se representaron los resultados en unidades arbitrarias.

### 3.9 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Para determinar de forma cuantitativa la inflamación sistémica los conejos se estudió la presencia de proteína-C-reactiva (PCR) en plasma mediante un kit específico para ELISA (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Esta misma técnica se utilizó para la cuantificación de proteica de leptina (SEA084, Cloud-Clone corp., USA) y adiponectina (SEA605 Cloud-Clone corp., USA.) sérica y de la membrana sinovial de los conejos siguiendo, en todos los casos, las instrucciones del proveedor.

### 3.10 Estudios de expresión génica

Para los estudios de expresión génica, se obtuvo el ARN total usando el reactivo TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) para las células cultivadas en monocapa y los tejidos homogeneizados, y el kit 'Nucleo Spin' de extracción de ARN en columnas (Machery-Nagel, Duren, Alemania) para los cultivos en esferas de alginato.

El ARN obtenido, se cuantificó con el sistema NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y un microgramo de ARN se retrotranscribió usando el kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), siguiendo las instrucciones del manual.

La expresión de ARN se cuantificó por PCR a tiempo real (qPCR) usando el sistema Step One Plus Detection system (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos específicos marcados con sonda fluorescente en el extremo 5', fueron comprados a Applied Biosystems.

Para los estudios en conejos se utilizaron las sondas TaqMan para *iNOS* (Oc04096740\_g1), *TNF* (Oc03397715\_m1,) *TGFβ1* (Oc04176122\_u1), *MMP1* (Oc04250657\_m1), *MMP3*

(Oc0397715\_m1), *BMP2* (Oc03824113\_s1) y sondas hechas bajo demanda para *IL1 $\beta$* , *COX2* y *MCP1*. Como control endógeno se utilizó *GAPDH* (Oc03823402\_g1).

Para los estudios en humanos se utilizaron las sondas TaqMan para *COL10* (Hs00166657\_m1), *MMP13* (Hs00233992\_m1), *ALP* (Hs01029144\_m1), *RUNX2* (Hs00231692\_m1), *ADAMTS5* (Hs00199841\_m1), *BGLAP* (Hs01587814\_g1), *IHH* (Hs01081801\_m1), *OPG* (Hs00900358\_m1) y *RANK-L* (Hs00243522\_m1). Como control endógeno se usó la sonda *HPRT*.

Para la detección de *COL2*, *AGG* se utilizó el sistema Step One Plus Detection system para la detección de Syber Green. Como control endógeno se usó la expresión mediante este mismo sistema de *GAPDH*. Para ello se diseñaron cebadores hechos a demanda que se muestran en la

Tabla 1.

Sonda	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'
<i>COL2</i>	GAAGAGTGGAGACTACTGG	CAATGTGTTTCTTCTCCTT
<i>AGG</i>	CACCCCATGCAATTTGAG	AGATCATCACCACACAGTC
<i>GAPDH</i>	ACAGTTGCCATGTAGACC	TTTTGGTTGAGCACAGG

Tabla 1 cebadores hechos a demanda para la detección de *COL2*, *AGG* y *GAPDH* mediante qPCR con Syber Green

La expresión de mRNA de los genes de interés fue normalizada por el mRNA del control endógeno en cada muestra. Los valores experimentales para cada gen fueron después normalizados por el valor de referencia, al que se le dio el valor 1.

### 3.11 Análisis estadístico.

Todos los resultados se representaron gráficamente y se analizaron utilizando la versión 5.0 del programa GraphPad Prism para Windows, (GraphPad San Diego California USA). Los resultados se representaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (S.E.M.) y se analizaron utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney o ANOVA de dos vías. La hipótesis nula se rechazó en cada análisis estadístico cuando el valor de *p* era mayor a 0,05. Las correlaciones entre los grupos se identificaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

---

## 4 RESULTADOS

---

Las importantes asociaciones observadas entre la OA y la desregulación lipídica o glucémica ponen de manifiesto la profunda influencia que ejercen distintos aspectos metabólicos el desarrollo de la patología. La constatación de estas asociaciones ha llevado, a que, en los últimos años, se haya intensificado la investigación en el área. A pesar de ello, no se conocen bien los mecanismos por los cuales estos factores metabólicos agravan la OA. En esta tesis hemos querido profundizar en los aspectos de la OA que se ven influenciados por un incremento en la concentración circulante de glucosa y de lípidos, estudiando los posibles mecanismos moleculares que explicarían un agravamiento de la OA asociado a estas alteraciones.

#### 4.1 Estudio de la de la hiperglucemia como inductor de la diferenciación hipertrófica de condrocitos. Papel de la modificación de proteínas por O-GlcNAc en este proceso.

En sujetos hiperglucémicos, las concentraciones de glucosa del líquido sinovial se encuentran igualmente elevadas, lo que podría afectar de manera negativa a los tejidos que componen la articulación (Mobasheri et al., 2002). De hecho, varios artículos publicados (Mobasheri, 2012; Rosa et al., 2009) concluyen que la exposición del cartílago articular a altas concentraciones de glucosa es perjudicial.

Una de las modificaciones que se produce, en distintos tipos celulares, como consecuencia de un incremento en la concentración de glucosa del medio, es un aumento de la O-GlcNAc de proteínas (Lunde et al., 2012; Slawson et al., 2010). Esto también se observa en el cartílago de pacientes con OA, caracterizado por la re-expresión de marcadores de hipertrofia (MH) condrocitaria, en el que se produce una acumulación de proteínas O-GlcNAcizadas, en comparación con el cartílago de sujetos sanos. Además, nuestro grupo ha demostrado que la O-GlcNAc proteica tiene una función esencial en la inducción de hipertrofia de una línea celular de pre-condrocitos (Andrés-Bergós et al., 2012).

Dado que la diabetes parece asociarse a una evolución más rápida de la OA, nuestro primer objetivo fue estudiar si la concentración elevada de glucosa, a la que están expuestos los condrocitos de pacientes diabéticos, podría inducir la expresión de MH en estas células. Asimismo, quisimos estudiar si el incremento en la O-GlcNAcización proteica era el mecanismo por el que esto se producía.

#### 4.1.1 Estudio de marcadores de hipertrofia en cartílago de pacientes artrósicos con hiperglucemia

Los pacientes diabéticos han demostrado tener una elevación de proteínas O-GlcNAc y debido a la relevancia de estas proteínas en el desarrollo de hipertrofia condrocitaria quisimos investigar si pacientes artrósicos que son, además, diabéticos muestran un incremento en la expresión de MH respecto a los pacientes OA sin alteraciones en el metabolismo de la glucosa.

Con este fin, seleccionamos una cohorte de pacientes artrósicos en la que estudiamos tanto pacientes sin alteraciones metabólicas (OA) como pacientes con alteraciones en el metabolismo de la glucosa (Diab). Incluimos en el grupo Diab tanto pacientes diagnosticados como diabéticos tipo II antes de la cirugía de reemplazo articular, como pacientes que, en el momento de la cirugía, tenían valores elevados de glucosa basal circulante, y valores altos de hemoglobina glicada (indicativa de una hiperglucemia sostenida en el tiempo). Los sujetos con hipercolesterolemia se excluyeron del estudio.

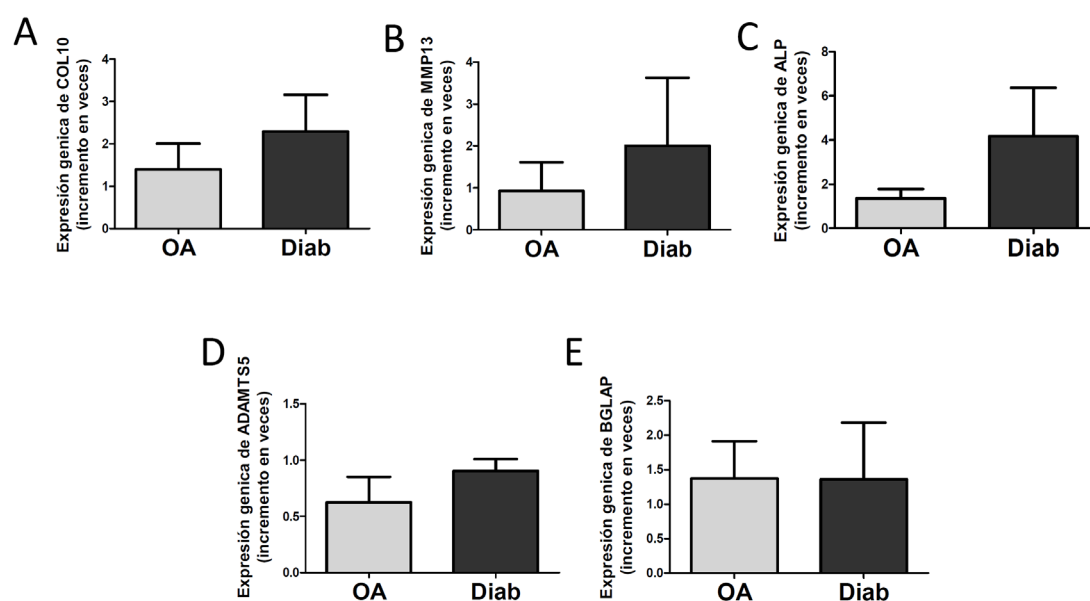


Figura 7. Expresión génica de MH (A) COL10, (B) MMP13, (C) ALP, (D) ADAMTS5 y (E) BGLAP en el cartílago de pacientes OA y Diab. Los resultados de 8 pacientes Diab respecto a 5 pacientes OA, están expresados como la media del incremento inducido  $\pm$  S.E.M.

Para llevar a cabo el estudio, medimos en el cartílago de los pacientes la expresión de los genes MH COL10, MMP13, ALP, ADAMTS5 y BGLAP (Figura 7). Todos los marcadores, con excepción de BGLAP, mostraron una tendencia a estar elevados en el grupo de pacientes Diab respecto a los controles que sólo tenían OA.



Por otro lado, se midieron los genes *COL2* y *AGG* (Figura 8), ambos marcadores de cartílago sano. A diferencia de los MH, estos mostraron una tendencia reducir su expresión en el grupo Diab respecto al grupo OA.

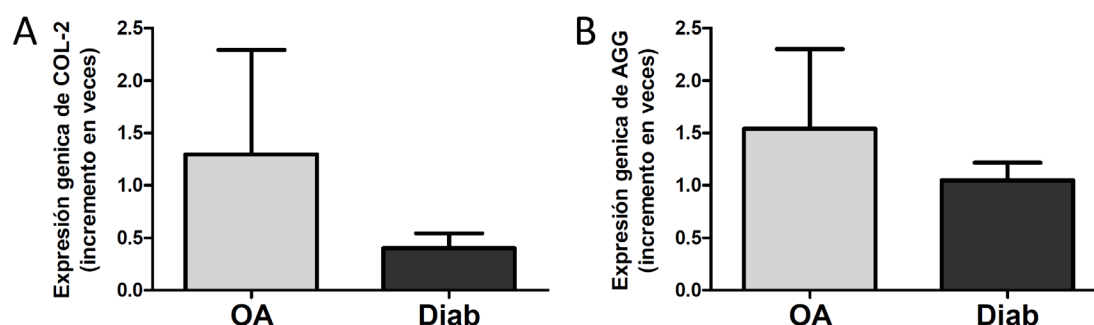


Figura 8. Expresión génica de genes marcadores de cartílago sano (A) *COL2* y (B) *AGG* en el cartílago de pacientes OA y Diab. Los resultados de 8 pacientes Diab respecto a 5 pacientes OA, están expresados como la media del incremento inducido  $\pm$  S.E.M.

Sin embargo, dada la alta variabilidad encontrada entre pacientes, y el reducido número de muestras de nuestro estudio, las diferencias que encontramos no alcanzaron valores estadísticamente significativos. Para confirmar nuestros datos y obtener resultados estadísticamente significativos, sería necesario estudiar una cohorte más amplia a lo largo del tiempo. De esta manera confirmaríamos si el cartílago de los pacientes diabéticos presenta una degradación más rápida o un peor pronóstico asociado a la hipertrofia condrocitaria.

#### 4.1.2 Efecto de elevadas concentraciones de glucosa in-vitro en condrocitos cultivados en esferas

En este trabajo quisimos estudiar si la hiperglucemia, podría provocar un aumento en la expresión de MH en el cartílago de pacientes artrósicos mediante el desarrollo de un sistema de experimentación *in-vitro* utilizando cultivos de condrocitos procedentes de pacientes artrósicos.

Los sistemas tradicionales de cultivo de condrocitos en monocapa han demostrado no ser adecuados para realizar experimentos extensos en el tiempo, ya que tienden a desdiferenciarse, perdiendo la expresión de marcadores condrocitarios como *COL2*, y a mostrar un fenotipo que recuerda a los fibroblastos, caracterizado por la expresión de *COL1* (Filip et al., 2015). Por esta razón, los cultivos se llevaron a cabo en esferas de alginato, permitiendo un cultivo de los condrocitos en tres dimensiones. Los condrocitos cultivados en tres dimensiones tienen un fenotipo más estable y una estructura circular similar al estado fisiológico de los condrocitos en el cartílago (Lin et al., 2009). Además, esta técnica permite realizar experimentos más largos en

el tiempo, incluso en ausencia de SFT, sin que la viabilidad de los condrocitos se vea afectada (Binette et al., 1998). Sin embargo, al igual que en el cartílago los condrocitos cultivados en esferas no se dividen, por lo que se requiere un número muy importante de condrocitos iniciales limitando así el tamaño muestral.

#### 4.1.2.1 Optimización del medio de cultivo para la observación de marcadores de hipertrofia en condrocitos artrósicos en 3D

Para establecer el medio basal más adecuado, estudiamos la expresión génica de tres de los MH más comunes *COL10*, *MMP13* y *ALP* en cuatro medios que contenían diferentes concentraciones de SFT, que ha sido descrito como un inductor de hipertrofia, o ITS que ayuda a la estabilidad fenotípica de los condrocitos (Binette et al., 1998; Pesesse et al., 2013; Zhang et al., 2009). Los diferentes medios de cultivo utilizados fueron:

- medio con SFT al 2%,
- medio con 1% de ITS,
- medio con 2% de SFT y 1% de ITS
- medio con un 10% de SFT

Los resultados mostraron que ninguno de estos medios altera significativamente la expresión génica de *COL10*, *ALP* ni *MMP13*, mientras que el medio con 10% SFT pareció inducir la expresión de algunos de estos genes (Figura 9). Seleccionamos el medio con 1% de ITS favoreciendo así la observación de cambios en los condrocitos en cultivo.

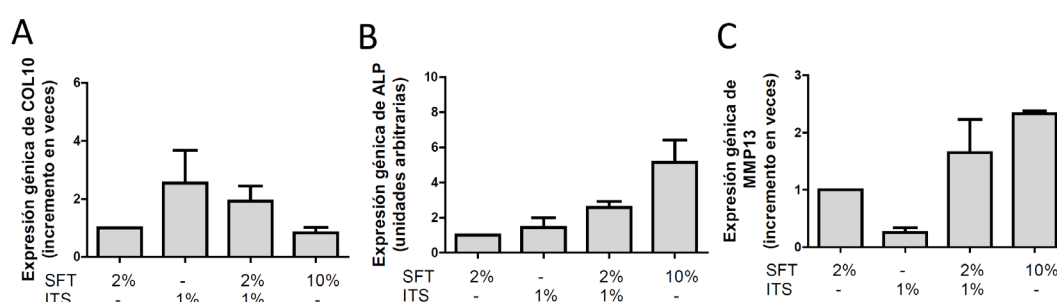


Figura 9. Expresión génica de marcadores de hipertrofia (A) *COL10*, (B) *ALP* y (C) *MMP13* en condrocitos cultivados en esferas. Las células fueron tratadas con medios a los que se les añadió un 2% de SFT, un 10% de SFT, un 1% de ITS o 2% de SFT y 1% de ITS durante 11 días. Los resultados de 3 experimentos independientes, están expresados como la media del incremento inducido  $\pm$  S.E.M. respecto al grupo con 2% de SFT.

#### 4.1.2.2 Expresión de genes de hipertrofia en cultivos expuestos a alta concentración de glucosa.

Con el objetivo de estudiar si una elevada concentración de glucosa modula la expresión de genes MH condrocitaria se cultivaron en paralelo condrocitos humanos artrósicos embebidos en esferas de alginato en una concentración normal de glucosa (4,5mM) (Basal) y condrocitos en alta concentración de glucosa (30mM) (HG).

Esta dosis de glucosa fue seleccionada para este trabajo, debido a que es una concentración que se ha utilizado habitualmente en diferentes trabajos que investigan los efectos de la hiperglucemia. De hecho, los pacientes diabéticos con una enfermedad mal controlada, en los que se han descrito alteraciones óseas, han mostrado concentraciones de glucosa circulante cercanas a este valor (García-Hernández et al., 2012; Rosa et al., 2009).

Estudiamos la expresión génica en los cultivos 4, 8, 11, 14 y 18 días tras empezar el estímulo con glucosa (Figura 10).

Pudimos observar que todos los genes MH, excepto *MMP13* y *RUNX2*, tendían a incrementar su expresión con el tiempo independientemente del medio de cultivo utilizado, probablemente debido a la tendencia a la hipertrofia de los condrocitos artrósicos. Sin embargo, los cultivos de condrocitos en HG mostraban una expresión significativamente mayor de *COL10*, *MMP13*, *ALP*, *ADAMTS5* e *IHH* que los cultivados en concentraciones de glucosa normal (Figura 10). Esto indica que, la elevada concentración de glucosa es capaz de incrementar la expresión de genes asociados con la diferenciación hipertrófica de los condrocitos artrósicos cultivados en 3D, en esferas de alginato, en comparación con los cultivados en una concentración normal de glucosa.

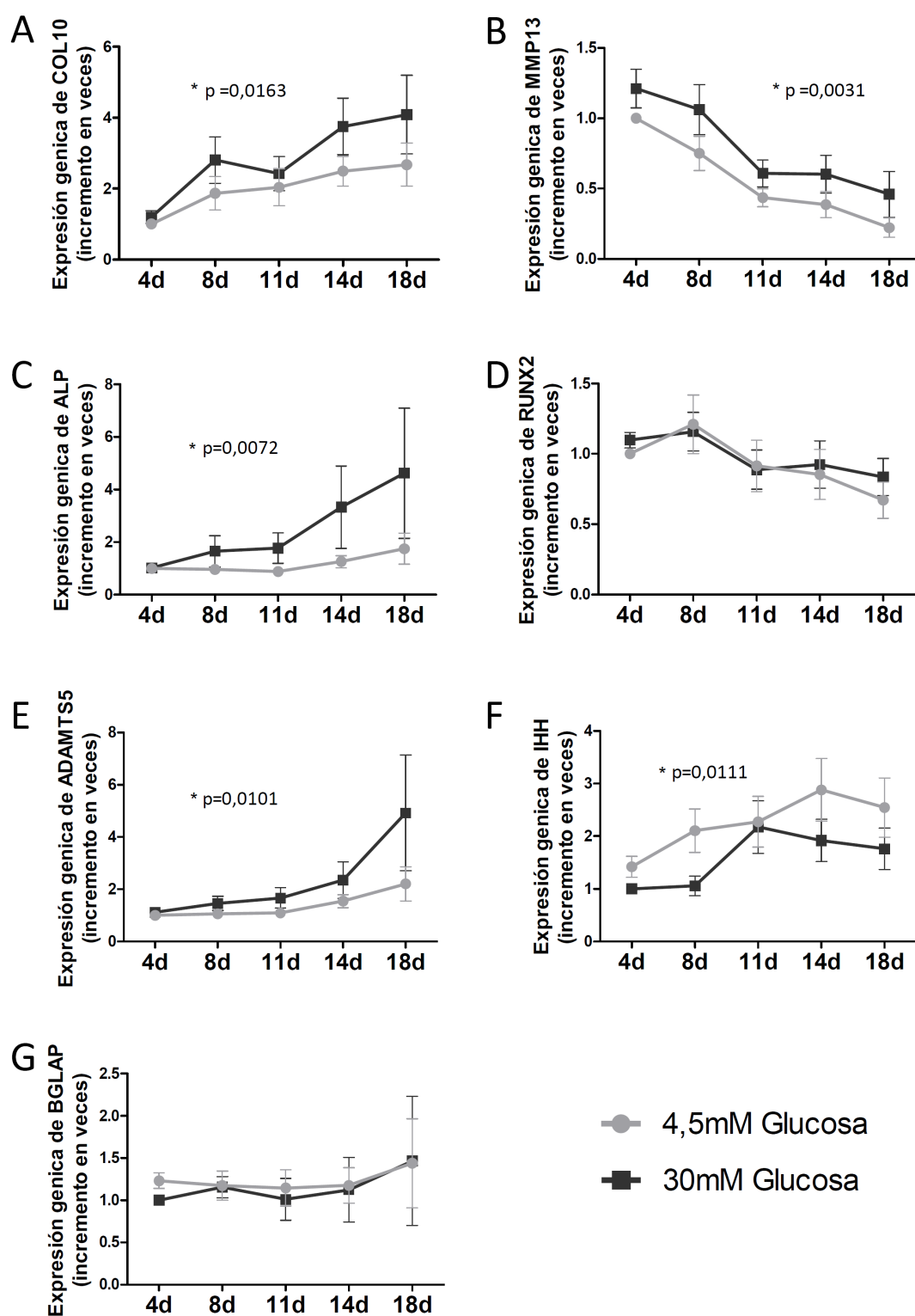


Figura 10. Expresión génica los MH (A) COL10, (B) MMP13, (C) ALP, (D) RUNX2, (E) ADAMTS5, (F) IHH y (G) BGLAP en condrocitos cultivados en esferas. Las células fueron tratadas con HG durante 4, 8, 11, 14 o 18 días. Los resultados de al menos 4 experimentos independientes, están expresados como la media del incremento inducido  $\pm$  S.E.M. respecto al Basal del día 4. La significación está calculada con un test ANOVA de dos vías.

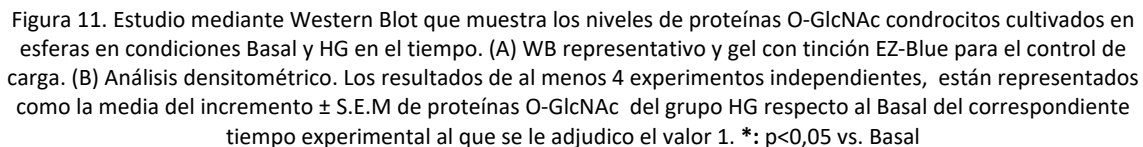
#### 4.1.3 El papel de la O-GlcNAc proteica en la hipertrofia condrocitaria inducida por glucosa

Nuestra hipótesis es que la O-GlcNAc proteica podría ser el vínculo patogénico entre la OA y la diabetes, puesto que un HG es capaz de inducir un incremento en la cantidad de proteínas O-GlcNAcizadas en varias estirpes celulares. Y como se ha mencionado previamente, nuestro laboratorio describió que la O-GlcNAc proteica es necesaria y suficiente para la expresión de genes MH condrocitaria, en una línea de pre-condrocitos *in-vitro* (Andrés-Bergós et al., 2012). Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue estudiar si el incremento que observamos en la expresión de MH inducido por HG, era mediado por un incremento de proteínas O-GlcNAcizadas.

Con este propósito, estudiamos si en los condrocitos cultivados en 3D, en HG incrementaba la O-GlcNAc proteica. Nuestros resultados mostraron que al menos hasta el día 11, en las células cultivadas en HG existía un incremento significativo de proteínas O-GlcNAcizadas respecto a las células control (Figura 11).

Además, quisimos comprobar si la modulación de la O-GlcNAc proteica afectaba a la expresión de MH.

Para ello, durante 11 días, conjuntamente con las células control cultivadas con una concentración normal de glucosa, y las cultivadas en medio HG, los condrocitos en esferas se trataron con DON, un inhibidor de la O-GlcNAc proteica que actúa como agonista de la GFAT (enzima limitante en la ruta de las hexosaminas) en HG (DON-HG). Paralelamente indujimos una acumulación de proteínas O-GlcNAc en una concentración normal de glucosa utilizando Thiamet-G (Thi), un inhibidor del enzima OGA responsable de eliminar el residuo O-GlcNAc de las proteínas. También utilizamos manitol (Mn) para tratar un grupo de células, como control del aumento de osmolaridad que produce la glucosa y tratamos con DON células cultivadas en condiciones de glucosa normal (DON) como control del efecto de esta molécula.



Tras 11 días en cultivo 3D, los condrocitos HG tenían una expresión significativamente mayor de los distintos MH, que las células control cultivadas con una concentración normal de glucosa, con la única excepción de ADAMTS5 (Figura 13).

Página | 44

(Figura 13). También se observaron cambios significativos, en la expresión de los MH *MMP13*, *RUNX2* y *ADAMTS5* cuando se inhibía la O-GlcNAc en los condrocitos cultivados en 3D durante 11 días en concentración normal de glucosa en presencia de DON respecto al grupo control cultivado con una concentración normal de glucosa.

Las células que acumularon proteínas O-GlcNAc como consecuencia del Thi no mostraron una mayor inducción de MH que los controles. Por tanto, la acumulación de proteínas O-GlcNAc no reprodujo el efecto de la HG (Figura 13).

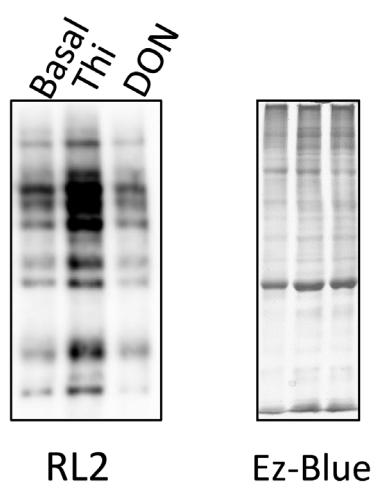


Figura 12. Estudio mediante *Western Blot* que muestra los niveles de proteínas O-GlcNAc condrocitos cultivados en esferas en condiciones de glucosa basal, un inhibidor (DON) y un acumulador de la O-GlcNAc (Thi). (A) WB representativo y gel con tinción EZ-Blue para el control de carga.

Los condrocitos cultivados en 3D durante 11 días en el medio Mn no modificaron significativamente la expresión génica de MH, descartando un posible papel del incremento de osmolaridad en el medio.

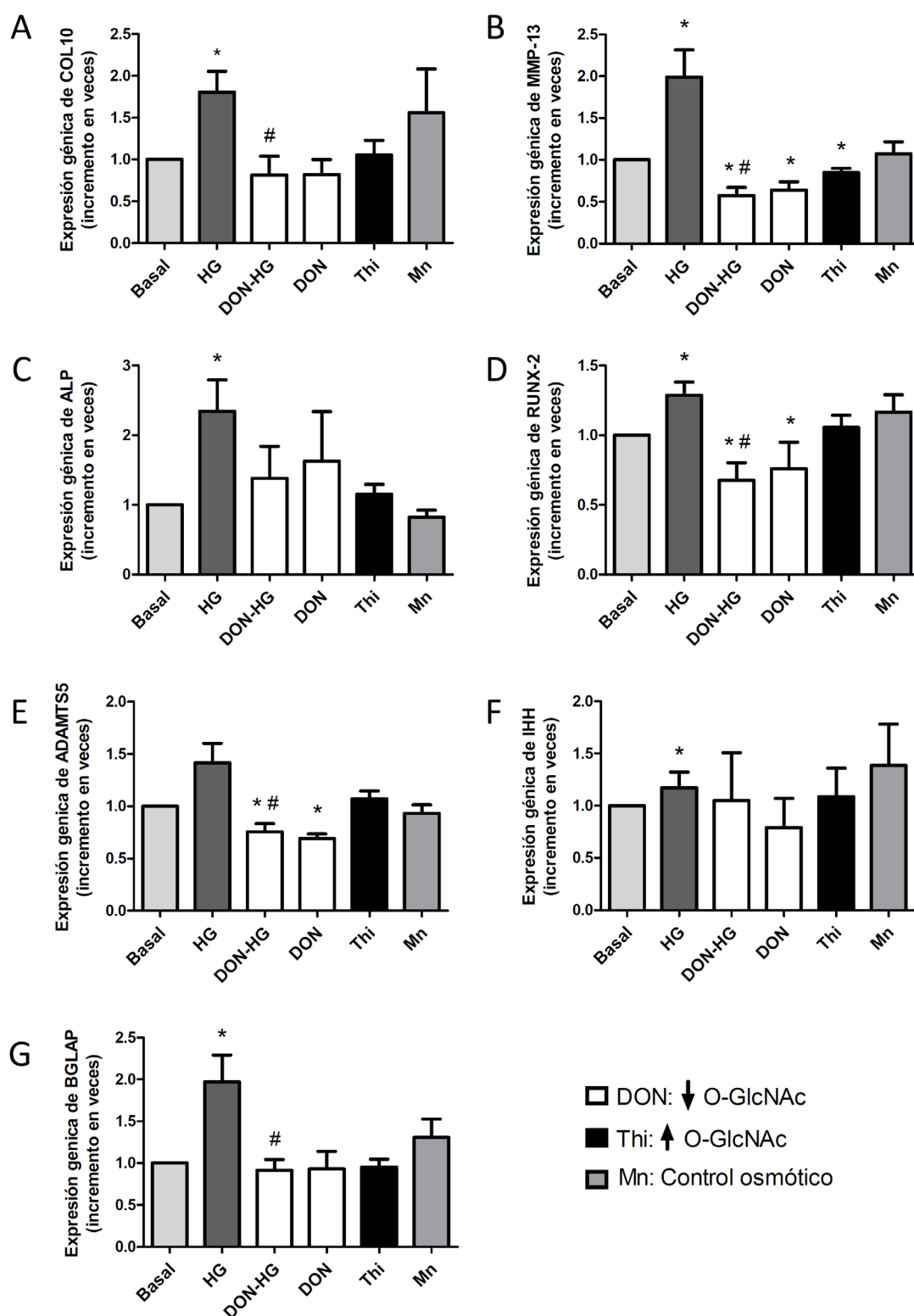


Figura 13. Expresión génica de MH A) COL10, (B) MMP13, (C) ALP, (D) RUNX2, (E) ADAMTS5, (F) IHH y (G) BGLAP en condrocitos cultivados en esferas. Las células fueron tratadas con HG, el inhibidor de O-GlcNAc, en condiciones de HG (DON-HG) o de glucosa normal (DON), del inductor de O-GlcNAc (Thi), y Mn durante 11 días. Los resultados de al menos 4 experimentos independientes, están expresados como la media del incremento inducido  $\pm$  S.E.M. respecto al grupo control. \*:  $p < 0,05$  vs. Basal; #:  $p < 0,05$  vs. HG



#### 4.1.4 Efecto de la concentración elevada de glucosa sobre el hueso subcondral y sobre la expresión de marcadores de remodelado óseo en condrocitos artrósicos

Durante la OA además de la una sobreexpresión de MH en el cartílago hialino, se producen cambios en el del hueso subcondral que ve incrementado su remodelado hasta en veinte veces con respecto al hueso normal (Huebner et al., 2014). En este proceso, la regulación de las células implicadas mediante el ratio de las proteínas OPG/RANK-L juega un papel central ya que cuando el ratio desciende se produce un incremento del remodelado óseo (Kearns et al., 2008) con un resultado neto de pérdida ósea.

Nuestro laboratorio comprobó que RANK-L puede difundir del cartílago al hueso subcondral, donde podría modificar la resorción ósea (Martínez-Calatrava et al., 2012; Moreno-Rubio et al., 2010). En este trabajo quisimos comprobar si la HG modifica la presencia de estos marcadores de remodelado en condrocitos artrósicos en cultivo.

##### 4.1.4.1 Disminución del ratio OPG/RANK-L in-vitro en respuesta a elevadas concentraciones de glucosa

Estudiamos la expresión génica de OPG y RANK-L en los cultivos de condrocitos 3D en esferas de alginato sometidos a medio Basal y HG, así como a las moléculas modificadoras de la O-GlcNAc, DON y Thi durante 11 días (Figura 14). Tanto la expresión génica de *OPG* como de *RANK-L* estuvo significativamente incrementada en condrocitos HG respecto a las cultivadas en medio Basal. Sin embargo, el aumento de la expresión génica de *RANK-L* en los condrocitos fue mayor que el de *OPG*. Como consecuencia, el ratio *OPG/RANK-L* fue significativamente menor en el grupo HG que en el Basal, lo cual, es indicativo de una mayor resorción ósea.

El papel de las proteínas O-GlcNAc también demostró ser relevante. La presencia del inhibidor de O-GlcNAc DON fue capaz de prevenir el incremento en la expresión tanto de *OPG* como de *RANK-L* inducido por una elevada concentración de glucosa. Además, en condrocitos cultivados con una concentración normal de glucosa, una acumulación de proteínas O-GlcNAcadas provocada por Thi fue capaz de incrementar de forma significativa la expresión de *RANK-L*, aunque este, fue de menor grado que la glucosa.

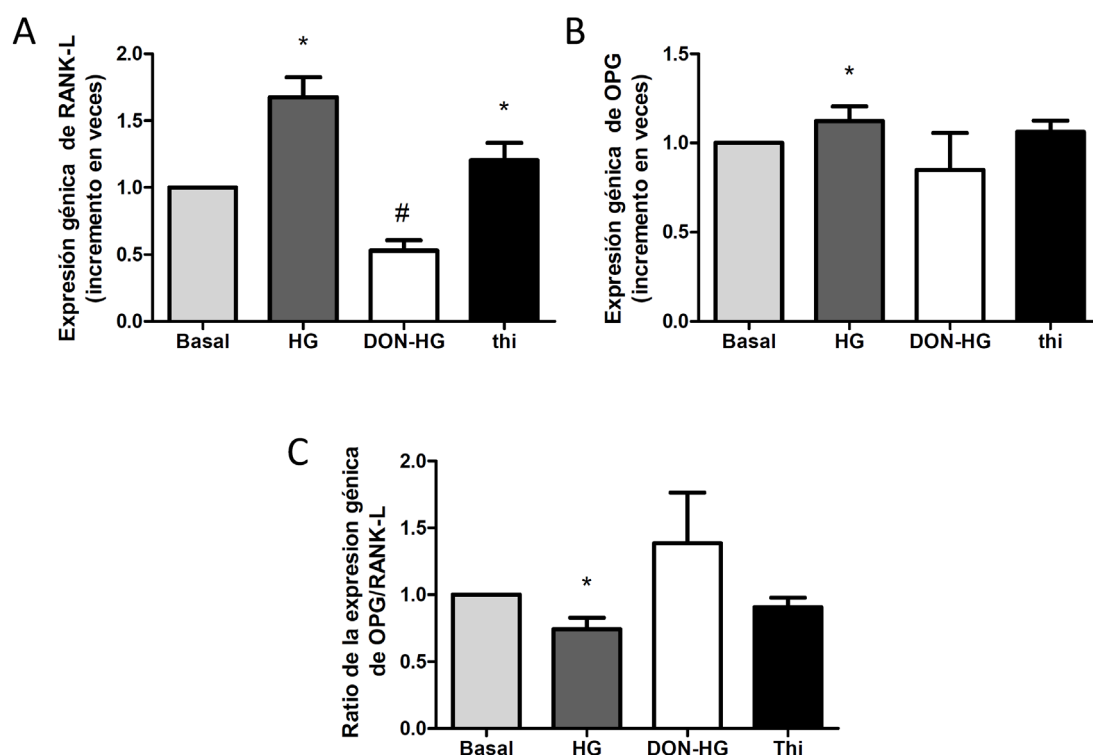


Figura 14. Expresión génica de (A) RANK-L, (B) OPG y (C) su ratio en condrocitos cultivados en esferas. Las células fueron tratadas con HG, el inhibidor de O-GlcNAC, en condiciones de HG (DON-HG), y del inductor de O-GlcNAC (Thi) durante 11 días. Los resultados de al menos 4 experimentos independientes, están expresados como la media del incremento inducido  $\pm$  S.E.M. respecto al control. \*:  $p < 0,05$  vs. Basal; #:  $p < 0,05$  vs. HG.

#### 4.1.4.2 Cuantificación de factores estructurales del hueso subcondral mediante $\mu$ CT

Para fortalecer la hipótesis de que la hiperglucemia podría estar afectando a la tasa de remodelado óseo en el hueso subcondral como sugerían los resultados anteriores, establecimos una colaboración con el laboratorio de Metabolismo Óseo del IIS-FJD dirigido por el Dr. Pedro Esbrit.

De esta forma, obtuvimos las tibias de ratas diabéticas procedentes de un modelo animal desarrollado en su laboratorio (Ardura et al., 2016). Los animales diabéticos, con una edad entre 18 y 20 meses, mostraban una constante de desaparición de la glucosa por debajo de  $2.5 \times 10^{-2}$ /min y niveles bajos de insulina. A su vez, analizamos las tibias de ratas control sanas de la misma edad y un peso comparable. En estas muestras estudiamos mediante una técnica radiográfica que utiliza un ordenador para crear imágenes en 3D en alta resolución,  $\mu$ CT, la fracción de volumen ocupado por hueso en un volumen total seleccionado del hueso subcondral (BVF, del inglés Bone Volume Fraction) tal y como se detalla en materiales y métodos.

Los resultados obtenidos indicaban que BVF del hueso subcondral en las ratas diabéticas era significativamente menor que en las ratas control lo cual es congruente con un incremento de la tasa de remodelado óseo.

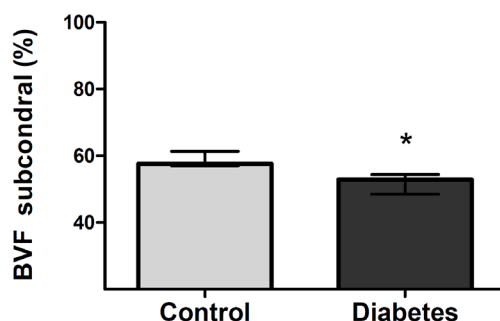


Figura 15. Análisis del porcentaje del VBF en un área seleccionada del hueso subcondral en ratas control y diabéticas medida por  $\mu$ CT. La grafica muestra el BVF medio  $\pm$  S.E.M. de 6 ratas con diabetes frente a 6 ratas control. \*:  $p < 0,05$  vs. Control.

#### 4.2 Influencia del incremento en la concentración de lípidos circulantes sobre la evolución de la OA en un modelo experimental en conejos

Además de las patologías relacionadas con el metabolismo de la glucosa, las alteraciones en el metabolismo lipídico también han sido asociadas con el riesgo de sufrir OA. De hecho, la asociación que existe entre la obesidad y la OA fue descrita hace más de 150 años. Sin embargo, distintos trabajos publicados en los últimos años apuntan a que el aumento de carga mecánica que sufren las personas obesas, no es el único factor responsable de que estos pacientes tengan mayor riesgo de sufrir OA (Richter et al., 2015). Como se ha mencionado, el tejido adiposo actúa como un órgano endocrino, y los factores liberados como las adipoquinas, podrían tener una gran influencia sobre la articulación (Gómez et al., 2011).

La obesidad está también estrechamente relacionada con la hipercolesterolemia. Sin embargo, existen pocos estudios que distingan cuál es el papel concreto de cada uno de estos factores en la aparición y la evolución de la OA.

En nuestro laboratorio, hemos desarrollado un modelo de OA en conejos que tienen un incremento en la concentración de lípidos circulante debido a la ingesta de una dieta rica en colesterol, y que no presentan obesidad, ni otras alteraciones que se han asociado a la dislipemia, como alteraciones en el manejo de la glucosa, o hipertensión.

#### 4.2.1 Caracterización metabólica del modelo

El modelo animal se llevó a cabo de acuerdo con los métodos descritos en el apartado anterior. Antes del sacrificio, extrajimos sangre de todos los animales para analizar su perfil bioquímico. La dieta rica en lípidos incremento significativamente tanto el colesterol total como los triglicéridos séricos de los grupos HFD y OA-HFD, ambos con respecto al grupo control. Sin embargo, las HDL no se vieron alteradas por la ingesta de esta dieta (Tabla 2).

Grupo	Colesterol (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Ganancia de peso (kg)	Glucosa basal (mg/dL)	TTG (ABC)	Tensión arterial (mmHg)	PCR (ug/mL)
<b>Control,</b> (n=10)	32,2 (8,9-55,5)	48 (31,7-64,3)	11,1 (8,6-13,6)	1,9 (1,7-2)	108,8 (101,5-116,1)	18,7 (16,1-21,2)	99,9 (93,2-106,5)	16 (8,2-23,7)
<b>HFD,</b> (n=6)	1876* (1139-2613)	253* (4-502)	12,5 (6,9-18,1)	1,45* (1,2-1,8)	105,2 (98,4-112)	21,2 (16,6-25,7)	103,2 (87,3-119)	39,1 (1-77,3)
<b>OA,</b> (n=9)	28,3 (18,2-38,4)	67,3 (39,7-95)	13,8 (10,2-17,3)	1,51* (1,2-1,8)	104,6 (94,4-114,8)	19,4 (16,3-22,5)	107,6 (95,8-119,4)	6,9 (3,7-10)
<b>OA-HFD,</b> (n=8)	2050* (1587-2514)	290* (99-480)	15,6 (11,0-20,3)	0,7* (-0,2-1,6)	104,3 (98,1-110,6)	18,2 (16,3-20,1)	106,2 (95,9-116,5)	18,1 (5,5-30,7)

Tabla 2. Caracterización del modelo de conejo Los valores representan la media con intervalo de confianza del 95% ;  
\* p <0,05 frente al control.

La dieta rica en lípidos no indujo una mayor ganancia de peso corporal ni en los conejos HFD, ni los OA-HFD. De hecho, al final del estudio, todos los grupos mostraron una menor ganancia de peso respecto a los conejos control (Tabla 2).

Con el fin de determinar si la ingesta de esta dieta inducía en los animales alguna alteración en el manejo de la glucosa, analizamos los valores de glucosa en ayunas de los animales y realizamos un TTG. Como se observa en la Tabla 2, no encontramos diferencias significativas en estos parámetros en el momento del sacrificio entre los diferentes grupos de estudio, indicando que ni la dieta rica en grasas, ni la OA, ni la combinación de ambos factores alteró de forma significativa el metabolismo de la glucosa en nuestros animales.

Tampoco hallamos diferencias en la tensión arterial que presentaban los distintos grupos a lo largo del estudio (Tabla 2).

Analizamos igualmente la concentración de proteína C reactiva (PCR) en el suero, con el fin de determinar si esta dieta rica en lípidos incrementaba la inflamación sistémica en los conejos, Ni

el grupo HFD ni el grupo OA-HFD mostraron un incremento significativo de PCR (Tabla 2), probablemente debido al pequeño tamaño muestral del que disponemos, ya que, cuando comparamos todos los conejos alimentados con dieta rica en lípidos (OA-HFD y HFD) con los alimentados con dieta estándar (OA y controles), pudimos observar que los niveles de PCR de los primeros eran significativamente más altos que los de los segundos ( $p=0,033$ )

#### 4.2.2 Efecto de la hiperlipidemia sobre la alteración del cartílago articular artrósico

Para evaluar si la hipercolesterolemia causaba algún impacto en la gravedad de las lesiones en el cartílago durante la OA inducida en los conejos, se utilizó la escala de evaluación del daño histológico en el cartílago conocida como escala de Mankin (Prieto-Potín et al., 2013). Para ello se evalúa la pérdida de condrocitos, los cambios estructurales, la formación de clonas y la presencia de proteoglicanos, en secciones de cartílago articular de los animales.

El grupo HFD no mostro diferencias significativas en ninguno de estos parámetros con respecto al grupo control. Los conejos de los grupos OA y OA-HFD obtuvieron un daño histológico significativamente mayor que el grupo control, ya que presentaban una mayor pérdida de condrocitos, una estructura menos homogénea, con presencia de clonas y una importante pérdida de proteoglicanos, que se refleja en una menor tinción. Sin embargo, no observamos un mayor daño histológico en el cartílago de los animales OA-HFD respecto a los OA (Figura 16). Aunque la hipercolesterolemia no incrementó la gravedad de las lesiones del cartílago, quisimos comprobar si existían diferencias en las propiedades del cartílago a nivel molecular.

Con ese fin, analizamos la expresión génica de distintos mediadores proinflamatorios en el cartílago de los animales (Figura 17).

Evidenciamos que, el grupo HFD presentaba un incremento significativo de la expresión génica de *TNF* respecto al grupo control. En los conejos OA también pudimos observar un incremento en la expresión de *TNF*, respecto al grupo control, así como de la expresión génica de *IL6* y *MCP1*.

En los conejos OA-HFD, la expresión génica de *TNF*, *IL6*, *MCP1* e *iNOS* estaba incrementada respecto al grupo control. Además, también observamos un incremento superior en la expresión de *TNF* en los conejos OA-HFD respecto al grupo OA, (Figura 17).

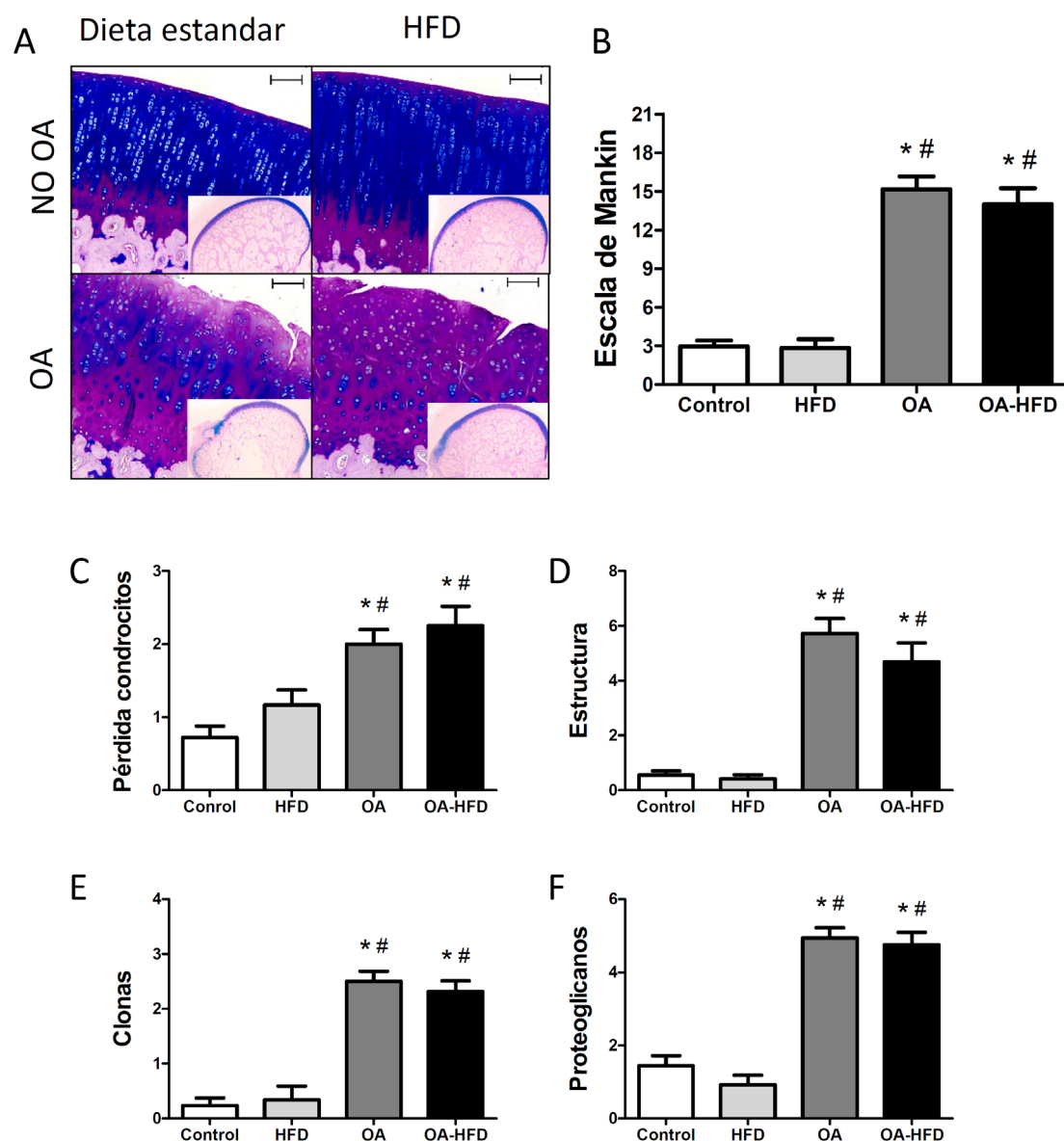


Figura 16. Histopatología del cartílago articular de la cabeza del fémur de los conejos los grupos Control, HFD, OA y OA-HFD. (A) Secciones representativas de cartílago teñidas con AlcianBlue; escala = 100  $\mu$ m. (B) puntuación global y (C-F) puntuación en cada subcategoría determinada por la escala de Mankin para la evaluación del daño articular. Los resultados de al menos 12 fémur por grupo, están expresados como la media del incremento inducido  $\pm$  S.E.M. respecto al grupo control. \*:  $p < 0,05$  vs. Control; #:  $p < 0,05$  vs. HFD.

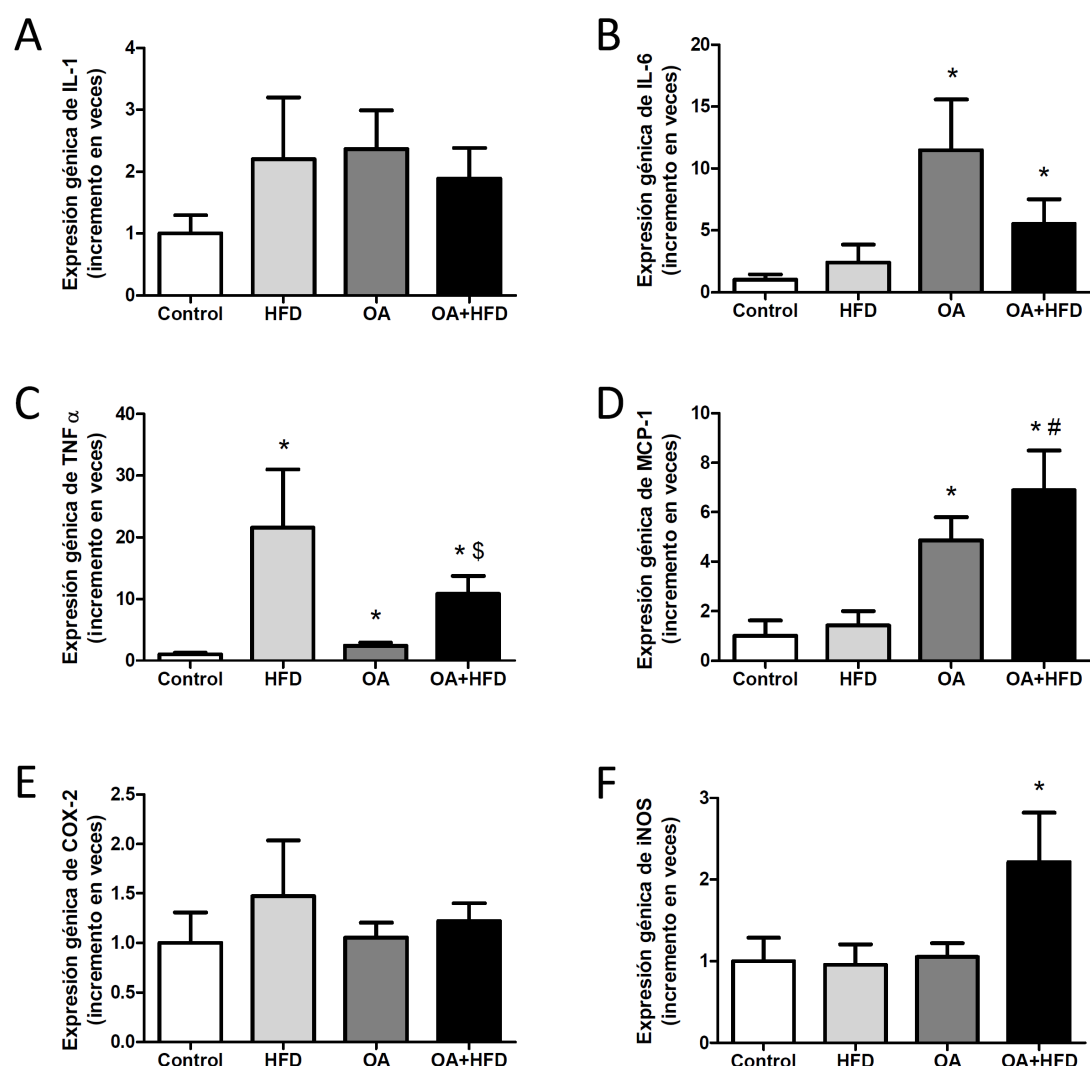


Figura 17. Expresión génica de los mediadores proinflamatorios (A) IL1, (B) IL6, (C) TNF, (D) MCP1, (E) COX2 y (F) iNOS en el cartílago de los conejos Control, HFD, OA y OA-HFD. Los resultados de al menos 7 muestras de cartílago por grupo, están expresados como la media del incremento inducido  $\pm$  S.E.M. respecto al grupo control. \*:  $p < 0,05$  vs. Control; #:  $p < 0,05$  vs. HFD; §:  $p < 0,05$  vs. OA.

Estos resultados mostraron que tanto la ingesta de una dieta rica en grasas, como la OA tienen la capacidad de inducir la expresión de ciertos genes proinflamatorios en el cartílago.

Además de analizar la expresión de estos genes proinflamatorios, quisimos comprobar si la dislipemia inducía cambios en la expresión génica de enzimas responsables de la degradación de la matriz extracelular del cartílago durante la OA (Figura 18).

Encontramos que la expresión de estos genes en el grupo HFD no presenta variaciones respecto al grupo control. En cambio, en el grupo OA la expresión de *MMP1* y *MMP13* se encontraba elevada, y la expresión de *BMP2* se encontraba disminuida con respecto al grupo control. En el

grupo OA-HFD pudimos observar un aumento significativo, respecto al grupo control, de todos los genes estudiados, a excepción de *BMP2*, que mostró una disminución significativa. En el caso de *MMP1* y *TGF $\beta$*  también pudimos comprobar que existía un incremento significativo en el grupo OA-HFD respecto al grupo OA (Figura 18).

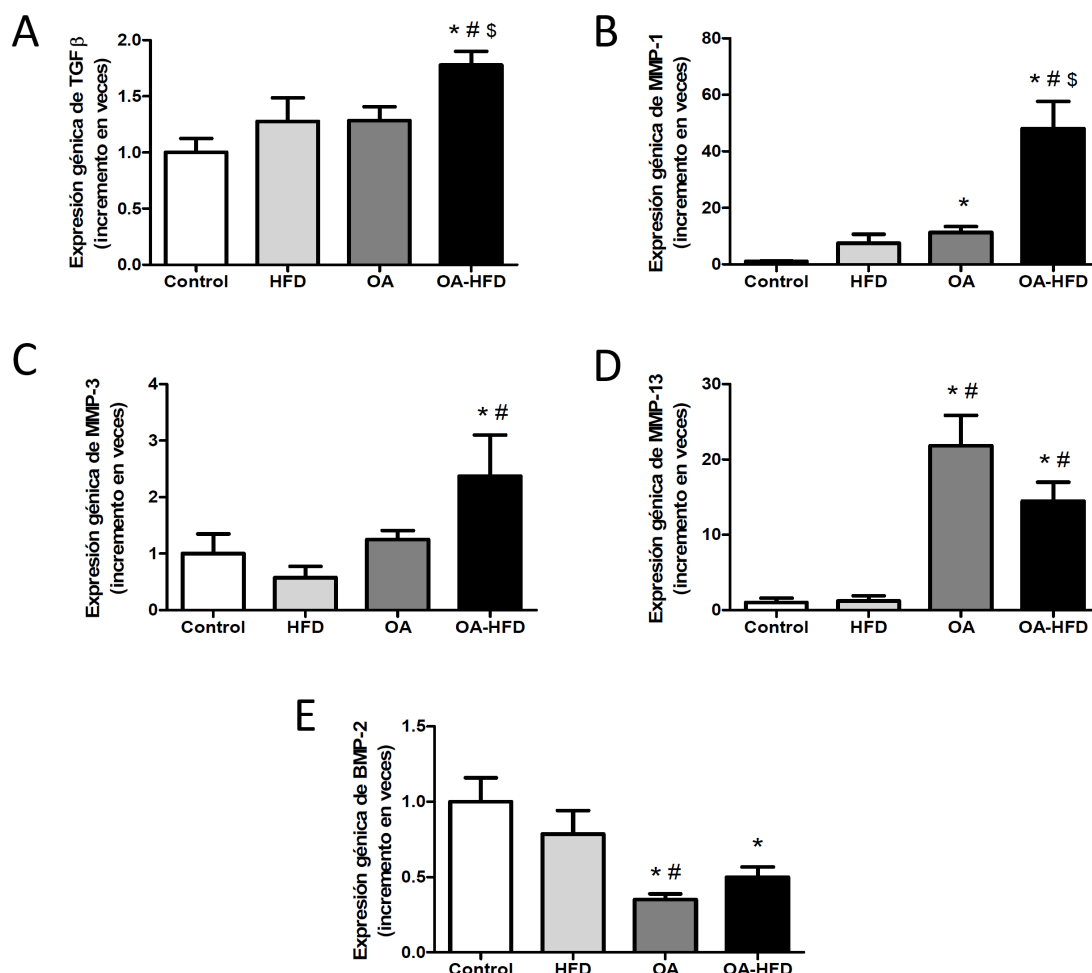


Figura 18. Expresión génica de mediadores que participan en el remodelado de la matriz (A) TGF $\beta$ , (B) MMP1, (C) MMP3, (D) MMP13, y (E) BMP2 en el cartílago de los conejos Control, HFD, OA y OA-HFD. Los resultados de al menos 7 muestras de cartílago por grupo, están expresados como la media del incremento inducido  $\pm$  S.E.M respecto al grupo control. \*:  $p < 0,05$  vs. Control; #:  $p < 0,05$  vs. HFD; \$:  $p < 0,05$  vs. OA.

#### 4.2.3 Formación de Osteofitos

En el modelo de OA en conejos, quisimos estudiar si la presencia de hiperlipidemia modificaba la aparición de osteofitos en la rodilla artrósica de los animales. Para ello, identificamos morfológicamente los osteofitos presentes en cortes histológicos teñidos con alcian blue PAS de la cabeza de fémur de los conejos en vista sagital tal y como se describe en materiales y métodos. Pudimos comprobar que en los grupos OA y OA-HFD había una importante presencia de



osteofitos. No encontramos diferencias significativas en la presencia o el tamaño de los osteofitos entre los grupos OA y OA-HFD.

#### 4.2.4 Remodelado Subcondral

Asimismo, quisimos estudiar si la dieta hiperlipémica tenía algún efecto sobre la densidad mineral ósea (DMO) subcondral de los conejos con OA, respecto al grupo control. La DMO es un parámetro que mide la presencia de contenido mineral en un área de interés. Para ello empleamos un densitómetro PixiMus siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior. Tanto los conejos HFD como los OA mostraron una reducción significativa de la DMO en el hueso subcondral de la tibia. La DMO subcondral de los conejos OA-HFD fue significativamente menor que en todos los demás grupos (Figura 19).

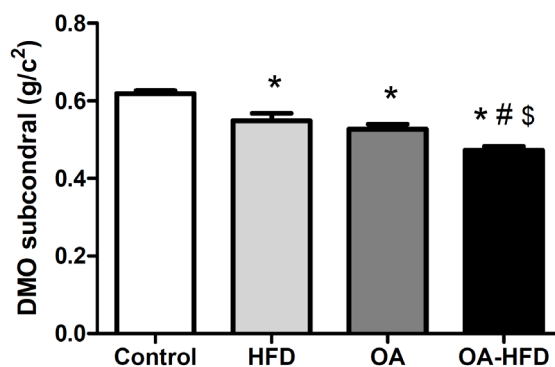


Figura 19. Análisis de la DMO de las tibias en una área seleccionada del hueso subcondral de conejos control, HFD, OA y OA-HFD medida mediante una densitometría de DEXA. Los resultados de al menos 14 tibias por grupo se muestran como la DMO media  $\pm$  S.E.M. respecto al grupo control. \*:  $p < 0,05$  vs. Control; #:  $p < 0,05$  vs. HFD; \$:  $p < 0,05$  vs. OA.

4.2.5 Efecto de la hiperlipidemia sobre la inflamación de la membrana sinovial artrósica. Nuestro siguiente objetivo fue evaluar el efecto de la dieta rica en grasa sobre las alteraciones de la membrana sinovial artrósica.

##### 4.2.5.1 Evaluación de la sinovitis con el score de Krenn

Primero, evaluamos la inflamación en la sinovial infrapatelar de los animales de nuestro modelo utilizando la escala de Krenn (Krenn et al., 2002), que evalúa la inflamación de la sinovia en cortes histológicos de este tejido.

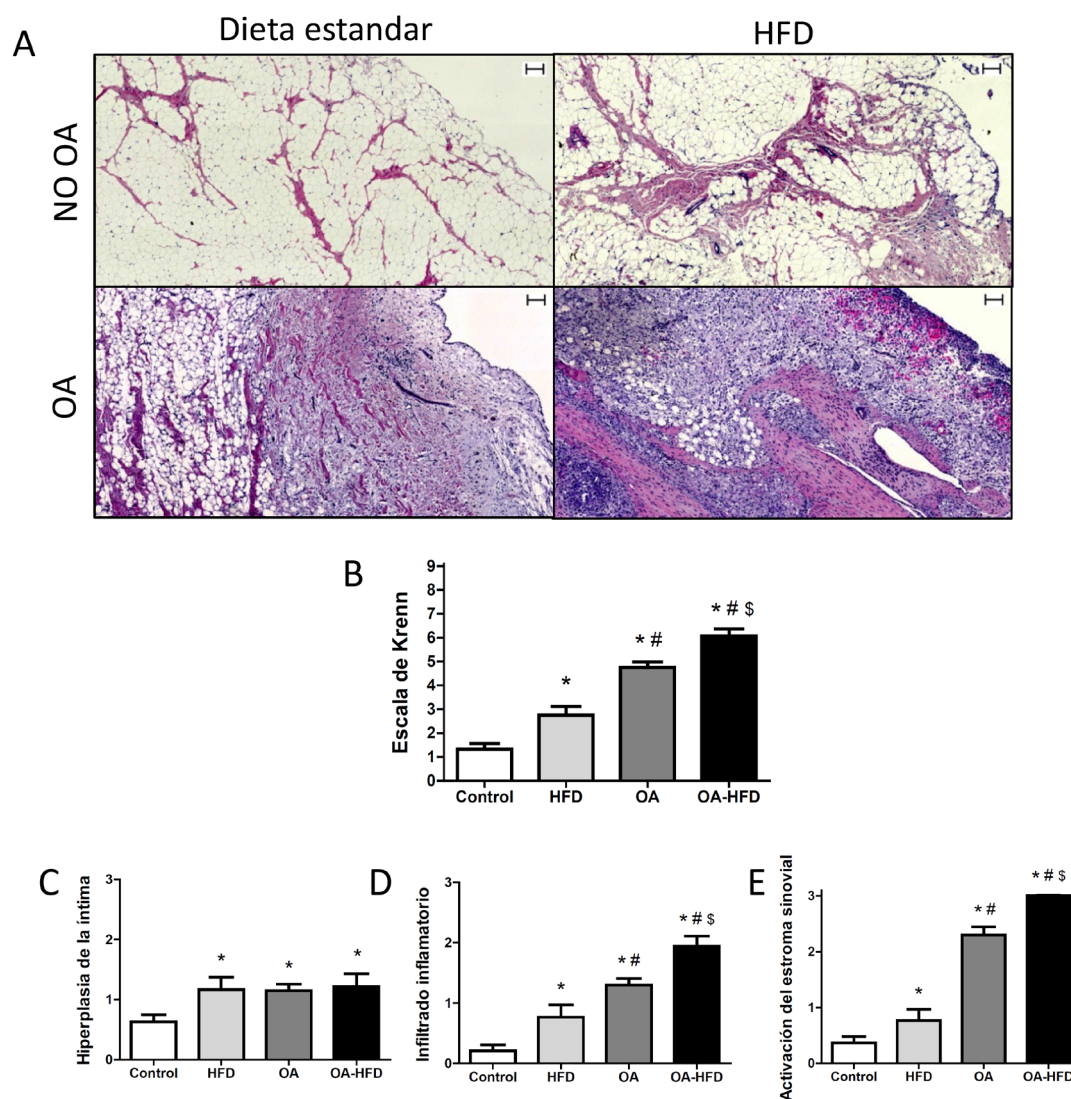


Figura 20. Histopatología de la membrana sinovial intrapatelar de los grupos Control, HFD, OA y OA-HFD. (A) Secciones representativas de las membranas sinoviales de los conejos teñidas con H-E. escala = 100  $\mu$ m. (B) Puntuación global y (C-E) de cada subcategoría determinada por el score de Krenn para la evaluación de sinovitis. \*:  $p < 0,05$  vs. Control; #:  $p < 0,05$  vs. HFD; \$:  $p < 0,05$  vs. OA.

El estudio mostro que las membranas sinoviales de los conejos del grupo HFD presentaban un moderado grado de hiperplasia de la capa íntima, una leve presencia de alteraciones en la activación del estroma en el intersticio y ligero infiltrado inflamatorio. Como resultado obtuvo una valoración significativamente más alta que el grupo control en la escala de Kreen (Figura 20), de lo que se deduce que, una dieta rica en lípidos por sí misma es capaz de inducir un grado moderado de sinovitis.

Los conejos del grupo OA mostraron también una sinovitis significativamente más severa que el grupo control mostrando además una importante activación del estroma y un mayor infiltrado inflamatorio que el grupo control. (Figura 20)

La sinovitis más severa la presentaban los conejos del grupo OA-HFD siendo esta significativamente mayor con respecto a todos los demás grupos. Este grupo además de una moderada hiperplasia de la capa íntima, mostró un intenso infiltrado inflamatorio y grandes cambios en la estructura del estroma. De hecho, todas las membranas de los conejos OA-HFD fueron evaluados con la máxima puntuación para la activación del estroma (Figura 20).

#### *4.2.5.2 Caracterización del Infiltrado macrofágico en la membrana sinovial inducida por hipercolesterolemia*

Para un análisis más detallado de los cambios en el infiltrado celular que presentaron los conejos como consecuencia de la dieta rica en grasa y la OA, realizamos una inmunohistoquímica para identificar los macrófagos presentes en los tejidos.

En el grupo HFD la dieta indujo una presencia importante de macrófagos fundamentalmente en la capa sub-íntima. En cambio, las sinoviales del grupo OA, en comparación tenía un infiltrado menos significativo y localizado en el estroma. La presencia de macrófagos fue especialmente importante en toda la extensión de la sinovial de los conejos OA-HFD y constituyó una importante diferencia con respecto al grupo OA (Figura 21).

Además, los macrófagos sinoviales de los grupos hipercolesterolemicos (HFD y OA-HFD) se caracterizaron por la presencia de gotas lipídicas en el citoplasma y se asemejaban morfológicamente a células espumosas proateroscleróticas, descritas anteriormente (Prieto-Potín et al., 2015; Prieto-Potín et al., 2013).

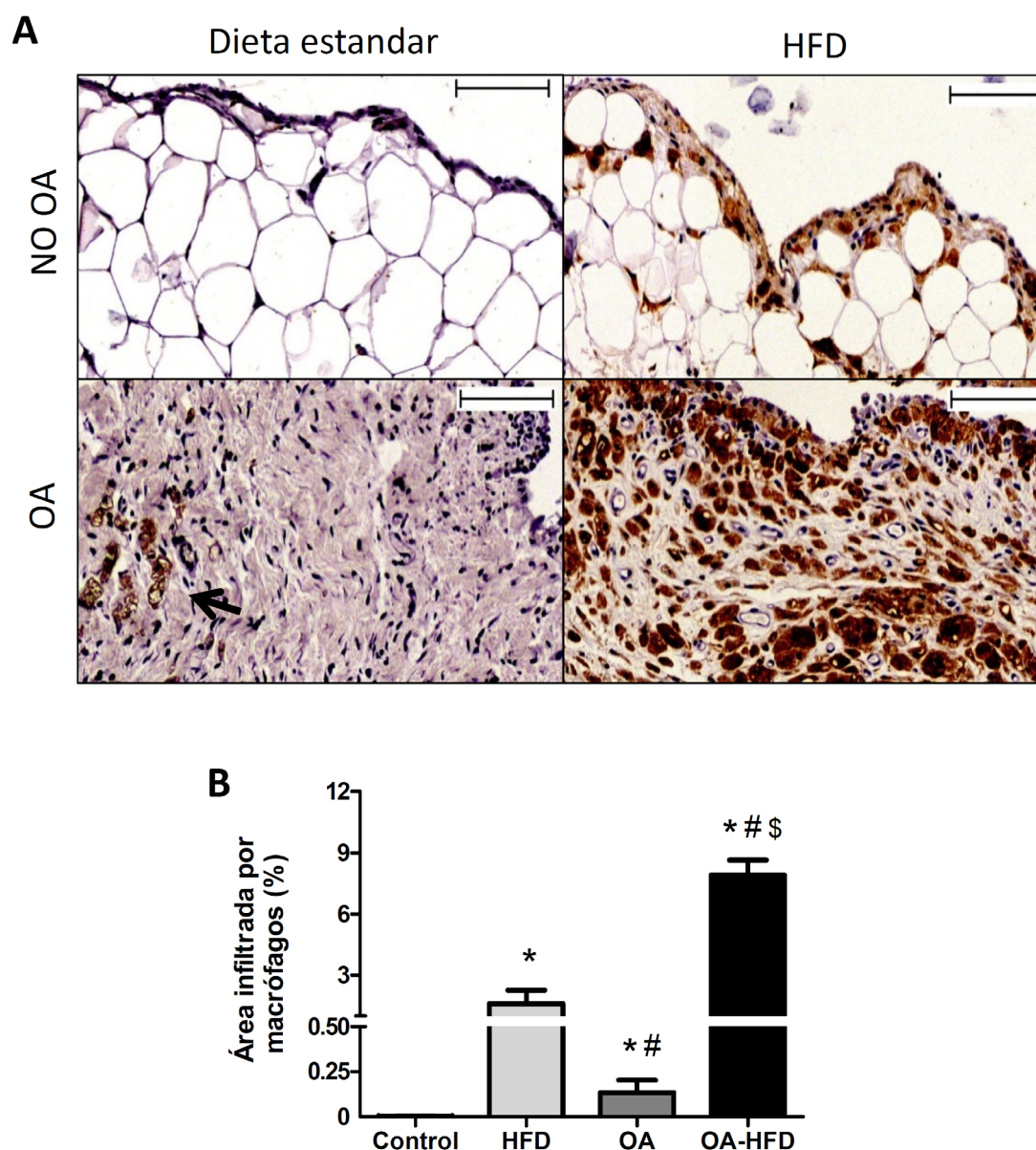


Figura 21. Inmunotinción de los macrófagos sinoviales. (A) Secciones representativas de las membranas sinoviales de los conejos teñidas con el marcador específico de macrófago de conejo RAM11. Escala = 100  $\mu$ m. (B) Cuantificación del porcentaje de área ocupada por las células RAM-11 positivas en la sinovial de cada grupo de conejos. Los resultados de al menos 7 muestras de sinovial por grupo, están expresados como la media del incremento inducido  $\pm$  S.E.M respecto al grupo control. \*:  $p < 0,05$  vs. Control; #:  $p < 0,05$  vs. HFD; \$:  $p < 0,05$  vs. OA.

#### 4.2.5.3 Caracterización del estroma sinovial

Con el fin de profundizar en los cambios histológicos que observamos en la membrana sinovial de los animales de nuestro modelo, decidimos evaluar la tinción de proteínas de matriz mediante tinción con tricrómico de Masson. Esta técnica tiñe de verde el colágeno y de rojo la fracción celular (Figura 22).



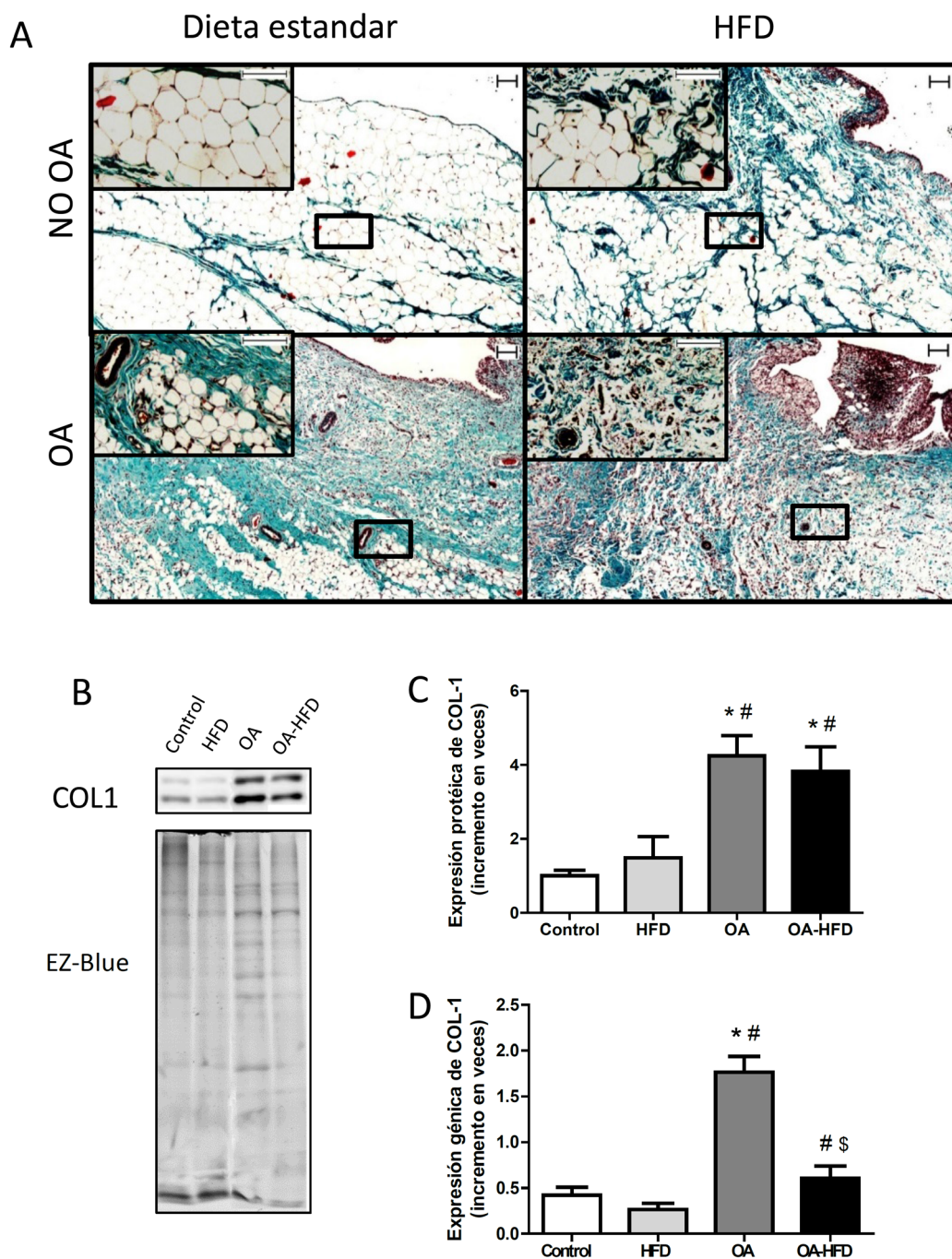


Figura 22. Caracterización del estroma sinovial de los conejos. (A) Secciones representativas de las membranas sinoviales de los conejos teñidas con Tricomico de Masson. (B) *Western blot* representativo de COL1 en la membrana sinovial de los conejos y gel con tinción EZ-Blue para el control de carga y (C) su respectivo análisis densitométrico. (D) Expresión génica de COL1 en membrana sinovial de los conejos. Los resultados de al menos 11 sinoviales, están representados como la media del incremento  $\pm$  S.E.M respecto al grupo control. \*:  $p < 0,05$  vs. Control; #:  $p < 0,05$  vs. HFD; \$:  $p < 0,05$  vs. OA.

Las membranas sinoviales del grupo control se componían principalmente de adipocitos rodeados de una fina matriz de colágeno y la atravesaban algunas estructuras fibrosas de soporte formadas por colágeno. Las sinoviales de los conejos HFD fueron similares a los

controles, compuestas principalmente por tejido adiposo pero algunas muestras presentaban, especialmente alrededor de la capa íntima, algunas áreas fibróticas compuestas por colágeno. En las membranas OA se apreciaba un estroma con áreas densas y laxas. Finalmente, las sinoviales de los conejos OA-HFD presentaban los estromas más fibrotizados con áreas muy densas y algunas áreas laxas (Figura 22).

Además del análisis por tinción tricómica de Masson, también se estudiamos la expresión génica y proteica del COL-1, proteína extracelular abundante en el estroma sinovial, en el tejido de los animales.

Tanto la expresión génica como la proteica de COL-1 se mantuvo invariable en las membranas de los conejos HFD respecto al grupo control. Como esperábamos, en concordancia con la mayor fibrotización, las membranas del grupo OA tenían una mayor expresión génica y de proteína COL-1 que el grupo control. En el grupo OA-HFD no encontramos un incremento en la expresión génica, no obstante, la expresión de la proteína COL-1 era significativamente mayor que en el grupo control y comparable al grupo OA (Figura 22).

#### *4.2.5.4 Caracterización del tejido adiposo en la membrana sinovial*

Otra de las alteraciones que observamos en los cortes histológicos de la sinovia de nuestros animales fue la variación en el contenido de tejido adiposo entre los diferentes grupos. Para poder analizar y cuantificar el tejido adiposo en la sinovial realizamos una tinción inmunohistoquímica de PLIN-1, un marcador de adipocitos viables, en nuestras muestras. Una vez identificamos los adipocitos en nuestras preparaciones, pudimos cuantificar el porcentaje de área del tejido que ocupaban, así como el tamaño medio de estas células en nuestro tejido (Figura 23).

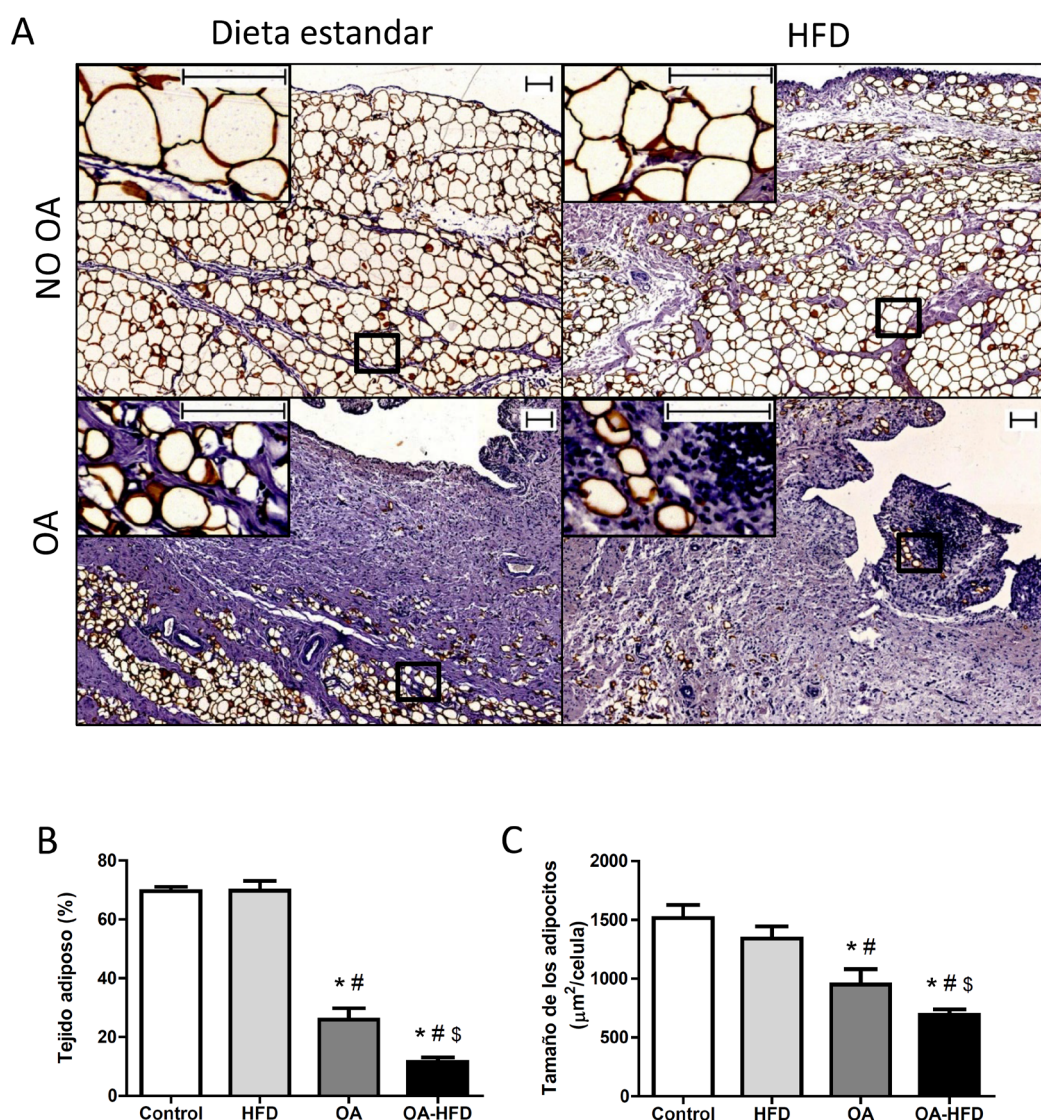


Figura 23. Inmunotinción de los Adipocitos viables. (A) Secciones representativas de las membranas sinoviales de los conejos teñidas con el marcador específico PLIN-1. Escala = 100 μm. (B) cuantificación del área que ocupan las células perilipina positivas en la sinovial de cada grupo de conejos. (C) Medida del tamaño medio de los adipocitos en cada grupo de. Los resultados de al menos 7 muestras de sinovial por grupo, están expresados como la media del incremento inducido  $\pm$  S.E.M respecto al grupo control. \*:  $p < 0,05$  vs. Control; #:  $p < 0,05$  vs. HFD; \$:  $p < 0,05$  vs. OA.

El porcentaje de tejido sinovial ocupado por adipocitos fue de un 70% en las membranas de los conejos controles y HFD. Este porcentaje descendía a un 26% en el grupo OA y en los OA-HFD ocupaba un 12% del área total.

Además del área total que ocupaban los adipocitos en el tejido, el tamaño de las células individuales también fue menor en el grupo OA respecto a los sanos y en el grupo OA-HFD los adipocitos eran menores que en todos los demás grupos (Figura 23).

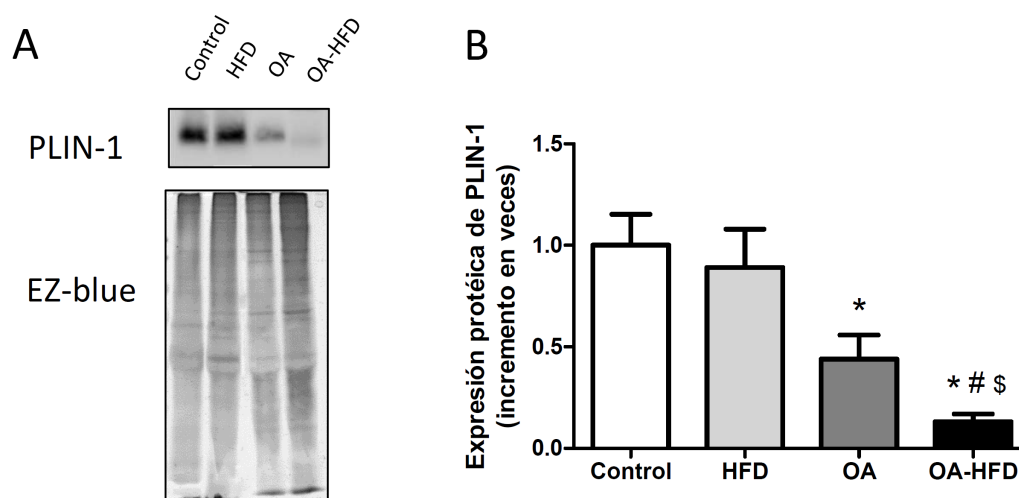


Figura 24. Estudio mediante *Western Blot* que muestra los niveles de PLIN-1 en membrana sinovial de los conejos Control, HFD, OA y OA-HFD (A) WB representativo y gel con tinción EZ-Blue para el control de carga y (B) el respectivo análisis densitométrico. Los resultados de al menos 11 sinoviales, están representados como la media del incremento  $\pm$  S.E.M respecto al grupo control. \*:  $p < 0,05$  vs. Control; #:  $p < 0,05$  vs. HFD; \$:  $p < 0,05$  vs. OA.

Adicionalmente se realizó un análisis de la PLIN-1 mediante de 'Western Blot' del tejido homogeneizado. Este experimento confirmó que en las sinoviales OA se expresa una menor cantidad de PLIN-1 que en los controles sanos. Y como ocurría con el porcentaje de área y el tamaño de los adipocitos, en el grupo OA-HFD, la expresión de la proteína PLIN-1 descendía significativamente respecto a todos los demás grupos (Figura 24), confirmando que existe una pérdida de adipocitos viables en la membrana sinovial de estos animales.

#### 4.2.5.5 Expresión de marcadores proinflamatorios en la membrana sinovial

Previamente se ha descrito que la membrana sinovial y el tejido adiposo asociado son una fuente de mediadores proinflamatorios en la articulación (Lambert et al., 2014; Sutton et al., 2009) Por lo que nuestro próximo objetivo fue estudiar si la hipercolesterolemia influía en su expresión. Para ello medimos mediante western blot la expresión de las proteínas IL-1, IL-6, TNF y COX-2.

El grupo HFD mostro un incremento significativo de COX-2 pero la expresión de los otros marcadores estudiados fue comparable al grupo control. En contraste, los conejos OA mostraron un incremento de todos los marcadores proinflamatorios estudiados. En los conejos OA-HFD la dieta contribuyo a que la inducción de las proteínas IL-1, IL-6 y TNF fuera además significativamente mayor que en el grupo OA. La expresión de COX-2 en los conejos OA-HFD incremento respecto al grupo control y al grupo HFD (Figura 25).



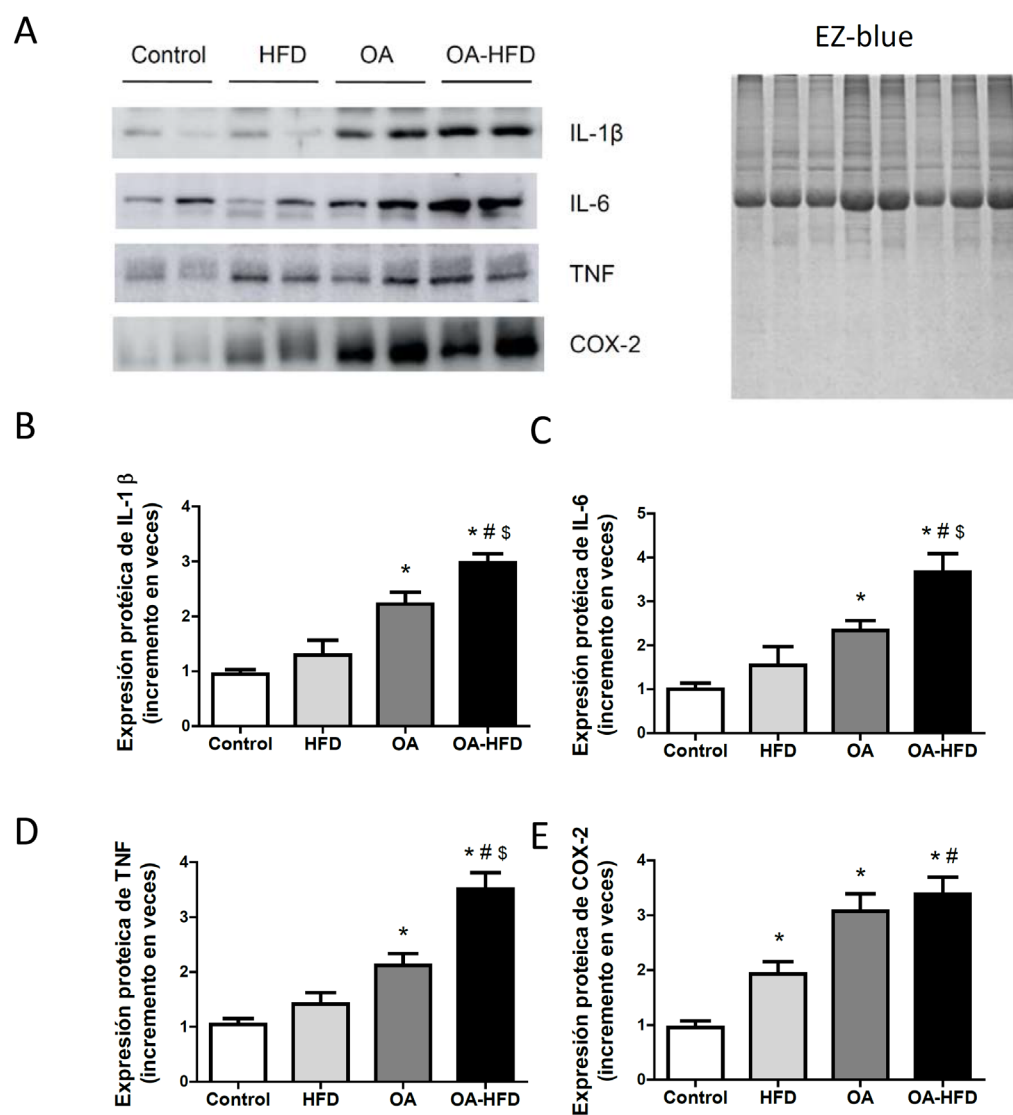


Figura 25. Estudio mediante Western Blot que muestra los niveles de IL-1, IL-6, TNF, y COX-2 en membrana sinovial de los conejos Control, HFD, OA y OA-HFD A) Western Blot representativos y gel con tinción EZ-Blue para el control de carga. (B-E) Los respectivos análisis densitométricos. Los resultados de al menos 9 membranas sinoviales están expresados como la media del incremento inducido  $\pm$  S.E.M. respecto al grupo Control. \*:  $p < 0,05$  vs. Control; #:  $p < 0,05$  vs. HFD; \$:  $p < 0,05$  vs. OA.

#### 4.2.5.6 Expresión de adipoquinas

En los últimos años, el papel que juegan las adipoquinas en la OA, y como los factores metabólicos pueden regular su expresión, ha sido muy discutido en la literatura. Debido a que el tejido adiposo es el principal productor de adipoquinas del organismo, y habiendo observado una importante destrucción del mismo en la sinovial infrapatelar, decidimos estudiar si como consecuencia de una dieta rica en lípidos, se modulaba la expresión de leptina y adiponectina tanto en el tejido, como de manera sistémica.

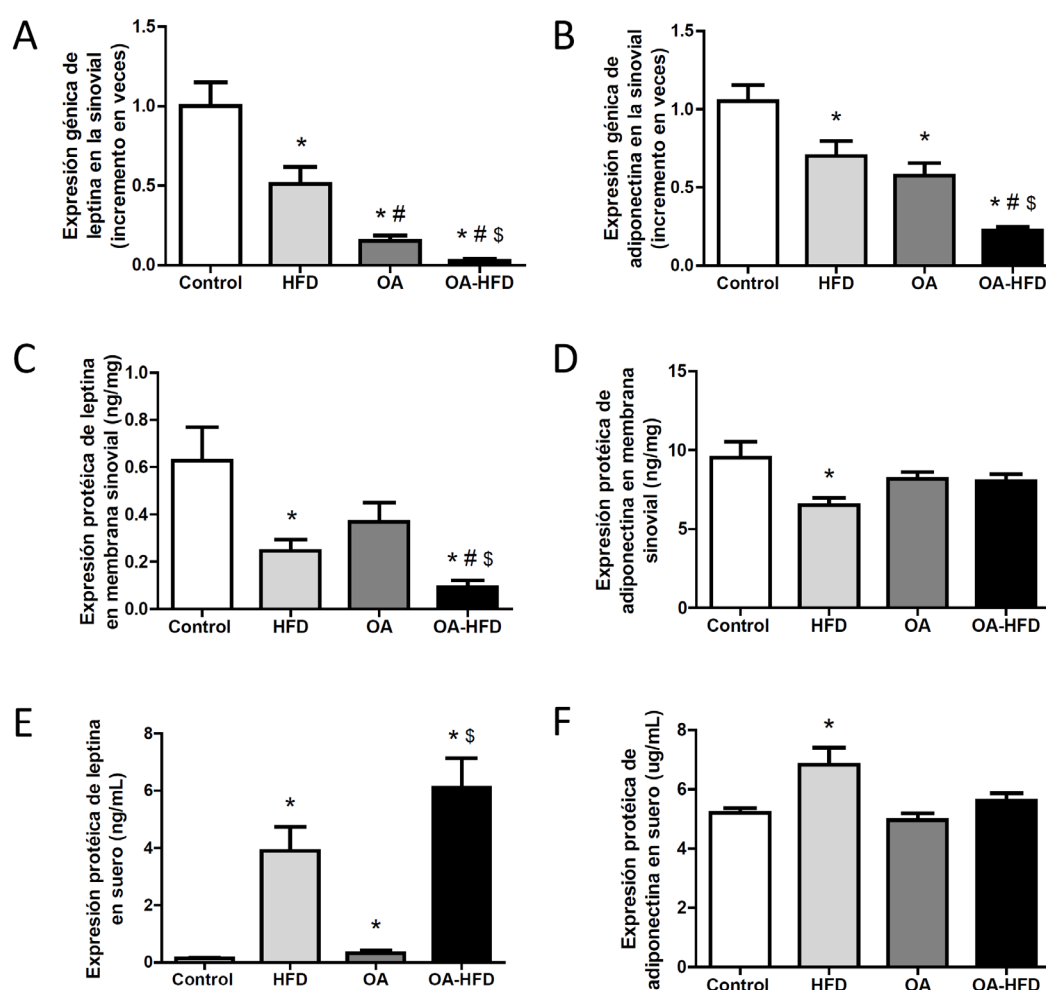


Figura 26. Estudio de la expresión de adipoquinas local y circulante en los conejos. (A) Expresión génica de leptina en la membrana sinovial. (B) Expresión génica de adiponectina en la membrana sinovial. (C) Expresión proteica de leptina en la membrana sinovial. (D) Expresión proteica de adiponectina en la membrana sinovial. (E) Concentración sérica de leptina. (F) Concentración sérica de adiponectina. Los resultados de al menos 6 muestras por grupo están expresados como la media del incremento inducido  $\pm$  S.E.M. \*: p<0,05 vs. Control; #: p<0,05 vs. HFD; \$: p<0,05 vs. OA.

La expresión génica de las dos adipoquinas estudiadas en la membrana sinovial fue negativamente regulada en los grupos HFD y OA respecto al control. Asimismo, como ocurría con el tejido adiposo infrapatelar, estos dos factores mostraron un efecto aditivo y en el grupo OA-HFD la expresión de adipoquinas fue significativamente menor que en todos los demás grupos (Figura 26). De hecho, encontramos una correlación significativa entre la expresión génica de la leptina y la adiponectina con el porcentaje de tejido adiposo ( $p < 0,000$  y  $p = 0,001$  respectivamente), así como con el tamaño los adipocitos ( $p = 0,008$  y  $P < 0,000$ ).

Además de la expresión génica, también cuantificamos la expresión proteica de las adipoquinas mediante ELISA.

Observamos una disminución significativa de leptina en el tejido de los conejos HFD respecto al grupo control. En el grupo OA, no observamos diferencias en la expresión proteica de leptina respecto al control. En los conejos OA-HFD la concentración de leptina estaba disminuida respecto a todos los grupos.

En el caso de la expresión proteica de la adiponectina, observamos una reducción significativa de proteína en el tejido en el grupo HFD respecto al grupo control, (Figura 26).

También quisimos cuantificar los niveles circulantes de estas adipoquinas en el suero de los conejos. Los conejos HFD mostraron un incremento significativo de leptina y adiponectina respecto al grupo basal. El grupo OA tenía una mayor concentración de leptina circulante respecto al grupo control, pero significativamente menor que el grupo HFD. No obstante, la concentración de la adiponectina de los conejos OA fue comparable a la del grupo control. Los conejos OA-HFD tenían unos niveles circulantes de leptina incrementados respecto a los controles y los conejos OA. Los niveles de adiponectina fueron semejantes al grupo control (Figura 26). Además, las concentraciones de leptina circulante se correlacionaron con los niveles de colesterol en suero ( $p < 0,000$ ).

---

## 5 DISCUSIÓN

---

Este trabajo es una contribución al avance del conocimiento sobre la influencia que ejercen los factores metabólicos en la OA, profundizado con ese fin en la relación de la OA con la hipercolesterolemia y la hiperglucemia, dos alteraciones metabólicas que han demostrado estar estrechamente relacionadas con la patología.

Hemos demostrado que tanto la hiperglucemia, como la hipercolesterolemia, favorecen el desarrollo de características patológicas descritas en la OA y hemos descrito algunos de los mecanismos por los cuales inciden en la patología.

### 5.1 Inducción de marcadores de hipertrofia en cartílago de pacientes artrósicos con hiperglucemia

Diversos autores han descrito la diabetes como un factor de riesgo independiente para la patología (Eymard et al., 2015; Nieves-Plaza et al., 2013). Además, la diabetes afecta negativamente a la progresión de la OA, puesto que los pacientes que sufren ambas condiciones se someten más, a edades más tempranas y con peor desenlace a cirugías de reemplazo articular (King et al., 2013; Meding et al., 2003). Asimismo, estos pacientes presentan síntomas más graves, como un mayor grado de dolor (Magnusson et al., 2015; Schett et al., 2013).

No obstante, los mecanismos por los que la diabetes influye sobre la OA no están establecidos. Se postula que productos de glicación avanzada (AGEs) podrían acumularse en la articulación incrementando el estrés oxidativo y la inflamación (Courties and Sellam, 2016). También se ha observado, que los condrocitos OA expuestos a alta glucosa no pueden regular correctamente el transportador de glucosa 1 (GLUT-1), lo que conduce a una mayor captación de glucosa y generación de ROS (Rosa et al., 2009). Una alta concentración de glucosa *per-se* puede tener un efecto perjudicial ya que puede saturar la vía glicolítica, activando de este modo otras vías secundarias implicadas en el metabolismo de la glucosa (Laiguillon et al., 2015).

En este trabajo hemos desvelado que los pacientes OA con un mal manejo de la glucosa tienden a tener una mayor expresión de MH que los pacientes OA que no presentan alteraciones en el metabólicas identificadas.

La expresión patológica de MH en condrocitos del cartílago articular es uno de los eventos más estudiados en la OA y su aparición o sobreexpresión son comúnmente utilizadas en diversos trabajos de investigación como indicativo de una OA más grave (Brew et al., 2010; Gauci et al., 2008; Wei et al., 2012). Sin embargo, los mecanismos que causan la expresión de estos marcadores en la OA no han sido totalmente esclarecidos.

## 5.2 Altas concentraciones de glucosa inducen la expresión de MH *in-vitro* en condrocitos artrósicos

La diabetes es una patología compleja en la que participan diversos mediadores. Es esta tesis hemos querido aislar el papel de la hiperglucemia en la inducción de MH mediante la optimización de un sistema de cultivo de condrocitos artrósicos en 3D.

Los experimentos realizados utilizando esta metodología, mostraron que las altas concentraciones de glucosa inducen una mayor expresión de MH. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que los pacientes diabéticos podrían padecer una OA más grave como consecuencia de una mayor expresión de MH.

La hipertrofia condrocitaria es un evento característico de la formación de ósea que ocurre en la etapa embrionaria y en la placa de crecimiento de los huesos. En etapas posteriores la matriz del cartílago se mineraliza, se produce una vascularización y tras la muerte de los condrocitos por apoptosis, el cartílago es reemplazado por hueso. Durante este proceso de diferenciación hipertrófica los condrocitos incrementan su actividad metabólica cambian la expresión de moléculas de la matriz extracelular y el patrón de expresión de proteasas, lo que favorece los posteriores cambios degenerativos (Dreier, 2010)

El cartílago hialino, sano, que forma parte de las articulaciones, no sufre esta diferenciación terminal. Sin embargo, muchos de los factores relacionados con la hipertrofia condrocitaria han demostrado participar en el desarrollo de la OA.

Se ha demostrado que los condrocitos hipertróficos, presentan una inducción de distintas rutas de señalización que incluyen la vía de fosfatidilinositol- 3-kinasa (PI3K)-AKT, la vía canónica de WNT, de BMP o de IHH entre otras (Ikegami et al., 2011; Zhong et al., 2015). Las alteraciones en estas rutas provocan una activación de RUNX-2 que a su vez regula la transcripción de distintos marcadores de hipertrofia condrocitaria (Zhong et al., 2015).

La vía del PI3K-AKT ha demostrado estar implicada también en la hipertrofia de otros tejidos o células como el músculo, el riñón, el corazón, fibroblastos o células epiteliales. Y se ha descrito que las altas concentraciones de glucosa pueden inducirla a través de un incremento de TGF $\beta$  (Wu and Derynck, 2009). Esta ruta altamente conservada tiene también un papel en procesos tales como angiogénesis, metabolismo, crecimiento, proliferación, supervivencia, síntesis de proteínas, transcripción y apoptosis (Hemmings and Restuccia, 2012).

La elevada concentración de glucosa también ha demostrado ser capaz de inducir la expresión de BMPs (Boström et al., 2011) y la vía canónica de Wnt promoviendo a su vez la acumulación

en el núcleo de  $\beta$ -catenina en distintas líneas celulares (Chouhan et al., 2016). En condrocitos durante la OE la acumulación de  $\beta$ -catenina, ha sido además descrito un potente inductor de hipertrofia condrocitaria (Dao et al., 2012).

Por tanto, la hiperglucemia característica de los pacientes diabéticos podría influir sobre estas rutas en los condrocitos articulares induciendo la expresión de genes de hipertrofia.

Aunque, el hecho de que la hipertrofia no ocurra de forma homogénea en el cartílago OA, sino de forma parcheada y a lo largo del tiempo (Hoyland et al., 1991), las limitaciones que conlleva trabajar con pacientes, el reducido tamaño muestral y la dificultad para probar estadísticamente la importancia de eventos biológicos en patologías crónicas, no nos permiten confirmar con certeza estadística estos resultados, este trabajo abre la puerta a la realización de un estudio en una cohorte más amplia que posibilite confirmar si el cartílago de los pacientes diabéticos presenta una mayor degradación o un peor pronóstico de la OA asociado a la hipertrofia condrocitaria.

### 5.3 El papel de la O-GlcNAc proteica en la hipertrofia condrocitaria inducida por glucosa

Una característica relevante de los pacientes diabéticos, es que presentan una acumulación de proteínas O-GlcNAc en distintos tejidos, puesto que, la adición y eliminación de O-GlcNAc es sensible al estado metabólico. Este incremento de proteínas O-GlcNAc también se puede observar en el cartílago de pacientes artrósicos (Tardio et al., 2011). Aunque la influencia de la diabetes en este proceso no ha sido estudiada, es razonable pensar que ejerce una importante influencia.

Esta MPT, es responsable de regular dinámicamente la función y destino de un elevado número de proteínas de diversa naturaleza (Bond and Hanover, 2015). Se ha demostrado además, que la O-GlcNAcilación puede alterar el estado de diferenciación celular en diversos tipos celulares (Sun et al., 2016).

En nuestro laboratorio demostramos, que la O-GlcNAc juega un papel central en el desarrollo de hipertrofia en la línea de pre-condrocitos ATDC5, que mimetiza la hipertrofia que se produce en placa de crecimiento óseo (Andrés-Bergós et al., 2012). Sin embargo, hasta ahora no se había estudiado el papel que juega la O-GlcNAc proteica en la expresión de MH en condrocitos del cartílago articular en la OA.

En este trabajo hemos comprobado que la HG es capaz de inducir un incremento de proteínas O-GlcNAc, en condrocitos cultivados de pacientes OA. Describimos además que los condrocitos

artrósicos cultivados en HG presentan una sobreexpresión de MH, que se inhibe en ausencia de proteínas O-GlcNAc. Sin embargo, la acumulación de proteínas O-GlcNAc mediante thiamet-G no reproduce la función de la glucosa como inductor de hipertrofia.

Estos resultados podrían explicarse si glucosa podría ejercer su efecto a través de varias vías que se complementen, una de las cuales requeriría la O-GlcNAc. Ello explicaría que, si se inhibe esta glicosilación, el proceso no puede completarse y los condrocitos no presenten una inducción de MH.

Varias de las rutas implicadas en el desarrollo de hipertrofia celular son influenciadas por la O-GlcNAc protéica. Un ejemplo es la ruta PI3K/AKT cuya modulación por esta modificación ha sido extensamente estudiada (Józwiak et al., 2014). Y de hecho varias de las proteínas implicadas en la ruta como PI3K, PDK1, y AKT son susceptibles de O-GlcNAcilarse.

También las involucradas en la vía Wnt placoglobina y  $\beta$ -catenina, pueden ser glicosiladas (Bond and Hanover, 2015; Hatsell et al., 2003).

Asimismo, RUNX2, considerada uno de los principales factores de transcripción involucrada en la hipertrofia condrocitaria podría estar activada por O-GlcNAc (Nagel and Ball, 2014)

Nuestros resultados, podrían explicarse, además, por una limitación de la disponibilidad de las proteínas específicas que necesitan ser O-GlcNAcizadas para inducir MH en los condrocitos del cartílago articular. En presencia de alta glucosa estas proteínas podrían verse sobreexpresadas tal y como se ha descrito previamente y simultáneamente O-glcNAcizadas. Así, una acumulación de proteínas O-GlcNAc mediante thiamet-G en condrocitos articulares, no sería suficiente para la inducción de hipertrofia.

En línea con esta hipótesis en un estudio proteómico realizado a partir de extractos enriquecidos en proteínas O-GlcNAc de cartílago articular de pacientes artrósicos y donantes sanos realizado en nuestro laboratorio (Jessica Andres Vergos, 2014), no pudieron identificarse las proteínas O-GlcNAc candidatas a tener un papel activo en la expresión de MH en la OA indicando su pequeña abundancia relativa en las células.

Cada vez son más trabajos los que le adjudican a la O-GlcNAc un papel como sensor nutricional que actúa sobre moléculas que participan en la regulación de la diferenciación celular. La diferenciación celular afecta el envejecimiento y a diversas patologías, y descubrir las funciones y mecanismos subyacentes que implican a la glucosa o la O-GlcNAc proteica permite explorar nuevos enfoques terapéuticos para las enfermedades que no cuentan con un tratamiento como la OA.



#### 5.4 Efecto de la concentración elevada de glucosa sobre el hueso subcondral y sobre la expresión de marcadores de remodelado óseo en condrocitos artrósicos

Un aumento de la rigidez en el hueso subcondral puede iniciar y promover la progresión de OA. Sin embargo, se produce una reducción temprana de la densidad mineral ósea subcondral en muchos modelos animales de OA lo que sugiere que los eventos de remodelación con reabsorción temprana son parte de la enfermedad. Además, la resorción ósea se incrementa en pacientes con OA de rodilla y la remodelación ósea subcondral se correlaciona con la gravedad de las lesiones del cartílago adyacente (Bertuglia et al., 2016).

En este trabajo hemos identificado una pérdida de hueso subcondral en ratas diabéticas. Este fenómeno también se ha observado en humanos. Los pacientes con OA que son además diabéticos y tienen hipertensión, sufren una mayor pérdida de hueso subcondral que los pacientes OA sin comorbilidades (Wen et al., 2013).

El remodelado del hueso subcondral se produce por osteoclastos que resorben hueso y por osteoblastos formadores de huesos que depositan osteoide que posteriormente se mineraliza. La función de los osteoclastos es controlada por el equilibrio entre la expresión de RANKL y OPG. Este equilibrio es esencial para la diferenciación y prevención de la muerte de los osteoclastos, y regula la resorción ósea.

Además de en el hueso, estos mediadores también se expresan en cartílago. De hecho, la expresión de RANK-L en el cartílago humano ha sido correlacionado positivamente con la severidad de la OA (Upton et al., 2012)

Nuestros datos nos muestran que el equilibrio *OPG/RANK-L* disminuye significativamente como respuesta a la alta glucosa en condrocitos OA cultivados en 3D. Además, describimos por primera vez que la O-GlcNAc proteica es necesaria y suficiente para la inducción de RANK-L implicada en este proceso.

Puesto que esta descrito que ciertos factores pueden difundir del cartílago al hueso subcondral el exceso RANK-L procedente del cartílago podría contribuir a desplazar el equilibrio *OPG/RANK-L* en el hueso subcondral y aumentar la tasa de resorción ósea. En un trabajo realizado con caballos con OA se concluyó que los niveles de expresión de RANK-L en el cartílago se correlacionaban mejor con la densidad de osteoclastos en el hueso subcondral y las microroturas en el cartílago calcificado, que con el RANK-L procedente del hueso (Bertuglia et

al., 2016). Se ha propuesto, que la expresión de RANK-L de los condrocitos podría actuar como un quimio-atrayente para los osteoclastos a la placa subcondral, contribuyendo a la pérdida focal de hueso subcondral y la aparición de microfisuras en cartílago calcificado. Los osteoclastos, al liberar cathepsina K, una potente colagenasa que degrada el hueso y el colágeno del cartílago, pueden participar en la degradación de la unidad osteocondral durante la progresión de OA. Así, se han observado zonas de resorción que se extienden desde el hueso subcondral al cartílago hialino (Shibakawa et al., 2005).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que la glucosa y su metabolismo podrían ser fundamentales en el desarrollo de la OA. Esto podría darse a través la hipertrofia condrocitaria y la inducción de resorción ósea en el hueso subcondral de los pacientes diabéticos que desarrollan OA. Este trabajo ayudaría de este modo a identificar nuevas dianas terapéuticas en este tipo de pacientes.

#### 5.5 La modificación de los mecanismos patológicos de la OA como consecuencia del hipercolesterolemia en los tejidos articulares de conejos artrósicos.

La obesidad es uno de los principales factores de riesgo para la OA. Aunque históricamente se ha vinculado al aumento de la carga en las articulaciones debido al aumento de peso, los factores mecánicos por sí solos no explican la mayor incidencia de OA en las articulaciones que no soportan peso, como las manos. Además, se ha demostrado que ratones obesos alimentados con una dieta baja en grasa no desarrollan OA. Estos hallazgos sugieren que factores distintos al peso corporal, como los niveles lípidos o circulantes las adipoquinas, deben contribuir a la OA. Sin embargo, debido a que estos desordenes metabólicos están estrechamente interconectados resulta muy difícil diseminar la aportación independiente de estas condiciones a la OA.

#### 5.6 La hipercolesterolemia no provoca un mayor daño histológico en el cartílago de conejos artrósicos

En esta tesis se ha analizado la influencia que tiene la hipercolesterolemia en el desarrollo de la OA en conejos que no presentan otras alteraciones metabólicas como obesidad o diabetes. En este modelo, hemos descrito los cambios que se pueden observar a nivel de hueso subcondral, cartílago y especialmente la membrana sinovial, cuyo estudio en el desarrollo de la OA está cobrando cada vez mayor relevancia.

En el modelo que hemos desarrollado no observamos un agravamiento de las lesiones histológicas del cartílago inducidas por la dieta rica en lípidos.

Estos resultados coinciden con los publicados por de Munter y sus colaboradores, que no observaron un mayor daño en el cartílago de ratones hiperlipidémicos (de Munter et al., 2013, 2016a). Sin embargo, en otros modelos desarrollados en ratas o ratones la hipercolesterolemia inducida por una dieta rica en lípidos provocó la aparición de lesiones en el cartílago (Gierman et al., 2014; Triantaphyllidou et al., 2013). También se ha descrito que la hipercolesterolemia puede agravar las lesiones provocadas tras inducir OA (Farnaghi et al., 2016).

Durante la OA, en respuesta al daño del cartílago, los condrocitos se activan para reparar la matriz extracelular dañada. A pesar de la mayor respuesta anabólica inducida por factores de crecimiento como TGF $\beta$ , el incremento paralelo de la síntesis de mediadores catabólicos resulta en última instancia la erosión del cartílago (Dumond et al., 2003).

Se ha observado que una dieta rica en lípidos o un incremento de LDL oxidadas puede inducir la expresión de TGF $\beta$  en la membrana sinovial (de Munter et al., 2013; Munter et al., 2017). En este trabajo hemos observado también un incremento de TGF $\beta$  en el cartílago de los conejos OA-HFD respecto al cartílago de los conejos OA.

El TGF $\beta$  tiene un papel dual en OA, ya que aunque tiene un efecto beneficioso en la reparación del cartílago es un importante inductor de la formación de osteofitos (van der Kraan and van den Berg, 2007; Larsson et al., 2015; Little et al., 2009). Varios trabajos han descrito un papel de la dieta hiperlipémica en su formación (Iwata et al., 2013; de Munter et al., 2016a). Así, TGF $\beta$  podría regular la proliferación de condrocitos y la función anabólica lo que explicaría que no observáramos un mayor daño histológico en el cartílago de los conejos hiperlipidémicos, sin embargo, podría inducir la formación de osteofitos durante la OA.

En el cartilago de los conejos OA-HFD, también hemos identificado cambios en la expresión de otros genes relevantes en la formación de osteofitos como TNF (Hamada et al., 2016) y MMP1 (Bord et al., 1997) respecto al cartílago de conejos OA. Este perfil de expresión génica indica que podría existir un aumento de osteofitosis en el grupo de conejos OA-HFD respecto al OA.

Sin embargo, la cuantificación de los osteofitos representa un desafío, ya que en modelos animales no es fácil identificarlos ni limitar su extensión de forma macroscópica. Su identificación en cortes histológicos también es complejo ya que están formados por varios tipos celulares en proporciones variables, los bordes de los mismos no están bien definidos (van der Kraan and van den Berg, 2007) y se ha descrito que distintos estímulos pueden variar las zonas en las aparecerían preferentemente (Blaney Davidson et al., 2007).

En este trabajo hemos definido los osteofitos histológicamente como irregularidades en el borde de los huesos que pueden encontrarse rodeados de una estructura cartilaginosa que, a su vez, puede estar rodeada de una capa fibrosa. identificados

Este resultado representa un avance puesto que nos ha permitido identificar y caracterizar los osteofitos en cortes histológicos, sin embargo son necesarios análisis más exhaustivos y el desarrollo de una técnica sistemática que incluya un estudio a nivel macro y microscópico en distintas localizaciones donde aparecen estas estructuras para observar diferencias entre los grupos.

La diversidad de resultados obtenidos por distintos grupos e investigación, podrían deberse a las diferencias en el metabolismo lipídico que existen entre las distintas especies o estirpes. Las ventajas de usar conejos para la investigación relacionada con el metabolismo de los lípidos han sido ampliamente discutidas (Fan et al., 2015, Yanni, 2004). En contraste con los ratones y ratas, en los seres humanos y conejos la mayoría del colesterol tiene un origen hepático y las LDL son las lipoproteínas plasmáticas predominantes. También el perfil de apoenzimas receptores de LDL hepáticos son similares en estas especies. Del mismo modo, los conejos, al igual que los humanos, presentan la actividad de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), es esencial para el metabolismo de las HDL.

### 5.7 Pérdida de hueso subcondral inducida por hipercolesterolemia

En trabajos previos publicados por el laboratorio pudimos observar una pérdida de masa ósea a nivel de hueso subcondral en los conejos OA (Roman-Blas et al., 2017). Los resultados de esta tesis demuestran que una dieta rica en lípidos agrava esta pérdida de hueso subcondral.

Resultados similares se han observado en mujeres menopáusicas, en las que se ha concluido que la hipercolesterolemia es un factor de riesgo independiente para la osteoporosis (Bijelic et al., 2016; Tarakida et al., 2011). Y se ha sugerido que las estatinas, fármacos usados comúnmente para la reducción del colesterol, podrían tener un impacto positivo en la regeneración ósea (Lin et al., 2015). También se ha descrito que los pacientes dislipémicos tienen más probabilidades de sufrir complicaciones ante una fractura (Zeng et al., 2017) y lesiones de médula ósea (Davies-Tuck et al., 2009).

En pacientes OA también se han identificado cambios de tipo osteoporótico en las zonas laterales, distantes a las lesiones del cartílago (Chiba et al., 2012). Y aunque está en discusión, algunos autores han descrito, en modelos animales, que el uso de fármacos que inhiben la resorción ósea son capaces de prevenir el daño en el cartílago durante la OA (Hayami et al.,

2004; Shirai et al., 2011; Zhang et al., 2011). Sin embargo, no existen estudios que evalúen si de estos cambios osteoporóticos que ocurren en la OA se ven agravados por la hipercolesterolemia en la OA en humanos.

#### 5.8 La hipercolesterolemia induce la Invasión de macrófagos y pérdida del tejido adiposo en la membrana sinovial

La detección de la sinovitis, se realiza utilizando diferentes metodologías como las distintas técnicas de imagen, la identificación macroscópica durante cirugías o valoraciones histológicas (Scanzello and Goldring, 2012). Además, se han descrito diferentes subtipos de sinovitis en etapas iniciales y tardías, como la caracterizada por un aumento del componente fibrótico o la caracterizada principalmente por el aumento de los parámetros inflamatorios, (Benito et al., 2005; Oehler et al., 2002). A pesar de ello, existe un importante consenso en que la inflamación sinovial puede promover una degeneración más rápida del cartílago y se correlaciona con la severidad de los síntomas de la OA como el dolor y la disfunción articular (Wei and Bai, 2016). Incluso se ha propuesto que la sinovitis podría preceder a la OA (Hügle and Geurts).

En modelos animales de OA, el daño sinovial ha sido descrito en diversas ocasiones y se caracteriza principalmente por una hiperplasia de la capa íntima, la presencia de infiltrado inflamatorio y una activación del estroma que se refleja en un incremento de síntesis de colágenos y presencia de fibrosis (van den Berg, 2008; Krenn et al., 2002; Lugo et al., 2012). La inflamación de la sinovial también causa un incremento en la expresión de mediadores proinflamatorios (Clockaerts et al., 2010; Sutton et al., 2009).

Recientemente se ha empezado a investigar la posible influencia de la hipercolesterolemia en la sinovial OA (de Munter et al., 2013, 2016b; Uchida et al., 2015). Sin embargo, el efecto que pudiera tener la hipercolesterolemia en las características de la sinovitis y sus alteraciones histológicas no están completamente definidas.

El modelo de conejos que hemos desarrollado en este trabajo nos ha permitido comprobar que la membrana sinovial infrapatelar sufre importantes cambios histológicos y estructurales como consecuencia de una dieta hiperlipidémica.

Hemos observado que la hipercolesterolemia *per-se* contribuye a la aparición de fibrosis y al reclutamiento de macrófagos a la membrana sinovial de conejos sin ninguna lesión articular previa. En cambio, los conejos a los que se les indujo OA presentaron una sinovitis caracterizada por una importante fibrosis y un leve infiltrado de macrófagos.

Además, las sinoviales de los conejos hipercolesterolémicos a los que se les indujo OA presentaron una sinovitis más grave que los conejos OA. Las sinoviales de este grupo se caracterizaban histológicamente, al igual que las sinoviales de conejos OA, por una importante fibrosis, pero además, también presentaban una mayor reducción del tejido adiposo que la observada en las sinoviales OA y un importante infiltrado de macrófagos.

Cuando el tejido sinovial se ve afectado por la fibrosis, se vuelve más grueso y más rígido. Además, contribuye al dolor y rigidez de las articulaciones, que son los principales síntomas de OA y se asocia con etapas avanzadas de la patología (Remst et al., 2015). Se define como un proceso de cicatrización de heridas no fisiológico, caracterizado por deposición excesiva de matriz extracelular (ECM). Típicamente es el resultado de inflamación o daño tisular y es mediado por factores como TGF $\beta$ , lisil hidroxilasa 2b (LH2b) y el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) entre otros (Remst et al., 2015).

Por otro lado, se ha propuesto que el infiltrado de macrófagos podría producirse como consecuencia de la inflamación local producida por la OA. La inflamación contribuiría a la oxidación de las LDL en la sinovial, induciendo mediadores quimiotácticos que atraerían macrófagos al tejido (Munter et al., 2017). Aunque la regulación metabólica de los macrófagos localizados dentro de la sinovial no está bien descrita, la exposición prolongada a lípidos podría resultar en un fallo de los mecanismos de manejo de lípidos, dando lugar a diferentes eventos lipotóxicos lo que podría explicar la reducción de tejido adiposo en las membranas sinoviales de conejos OA-HFD. Además, Uchida y sus colaboradores sugirieron que el subconjunto de macrófagos proinflamatorios en la sinovial podría ser responsable del aumento de la síntesis de TNF y del remodelado de la matriz extracelular observado en la membrana sinovial de ratones OA hiperlipidémicos (Uchida et al., 2015). En línea con estos datos, en la sinovial de conejos OA-HFD observamos un aumento de la expresión de las citoquinas proinflamatorias, incluido el TNF.

También en el tejido adiposo de pacientes obesos y modelos animales se han identificado características similares a las que presentan las sinoviales de los conejos hipercolesterolémicos de nuestro modelo (Abdenmour et al., 2014; Bourlier et al., 2012; Buechler et al., 2015; Sun et al., 2013). Curiosamente, tal y como observamos en las sinoviales de nuestro modelo, se ha descrito en que las zonas de tejido adiposo humano que sufren fibrosis presentan adipocitos de menor tamaño (Divoux et al., 2010).

En el tejido adiposo de pacientes obesos, se ha propuesto que la fibrosis y la presencia de macrófagos se producen como consecuencia de la expansión en el tejido adiposo, que se produce principalmente a través de la hipertrofia de los adipocitos. Esta hipótesis postula que

el crecimiento de los adipocitos podría ser limitado. Ante un exceso de nutrientes estas células no podrían expandirse más y los lípidos se acumularían en otros tejidos (Spencer et al., 2011). Esto ocurriría, porque, a medida que crecen los adipocitos, podrían llegar a ser hipóxicos y activar la vía HIF, que a su vez, activa rutas de señalización que regulan la producción de quimioquinas que atraerían macrófagos y citoquinas pro-inflamatorias en los adipocitos. Además, la presión física que ejerce sobre los adipocitos la matriz extracelular, también podría estimular la producción de quimioquinas, e incluso conducir a la ruptura de los adipocitos. Este incremento de quimioquinas junto con la muerte de los adipocitos podría provocar la infiltración macrofágica (Virtue and Vidal-Puig, 2010).

Por lo tanto, nuestros datos sugieren que la presencia de hiperlipidemia podría agravar la inflamación sinovial OA aumentando la presencia de macrófagos inflamatorios, en asociación con la destrucción del tejido adiposo.

#### 5.9 La expresión de adipoquinas en la membrana sinovial difiere de los niveles circulantes

La función de las adipoquinas como nexo de unión, independiente al estrés mecánico, entre las patologías metabólicas y la OA es cada vez más aceptado por la comunidad científica (Hu et al., 2011). Diversos trabajos han concluido que los niveles séricos de leptina y adiponectina son significativamente mayores en pacientes con OA que en controles sanos y se correlacionan con la gravedad de la enfermedad (Filková et al., 2009; Koskinen et al., 2011; Ku et al., 2009; Lübbecke et al., 2013). Sin embargo, el papel de la adiponectina es fuente de debate ya que, también se ha identificado una relación inversa entre las concentraciones en plasma y líquido sinovial de adiponectina con la gravedad de la OA (Giaginis et al., 2012)

La almohadilla adiposa infrapatelar asociada a la sinovial infrapatelar ha sido propuesta como una posible fuente de adipoquinas que aceleran la progresión de la patología (Conde et al., 2014).

En cambio, nuestros resultados muestran una reducción en la expresión génica de leptina y adiponectina en la sinovial infrapatelar, que se correlaciona con la reducción del tejido adiposo.

En contraste, la leptina circulante está significativamente incrementada en los conejos hiperlipidémicos HFD y OA-HFD y sus niveles se correlacionan con los niveles de colesterol en suero.

En este sentido, nuestros datos concuerdan con trabajos previos que indican que la hiperlipidemia podría ser un factor agravante de la OA mediante la estimulación de mediadores proinflamatorios sistémicos (Robinson et al., 2016).

Los conejos OA, también presentaban un incremento de la leptina circulante respecto a los conejos control, como se ha descrito previamente tanto en OA humana como experimental (Hu et al., 2011). Diferentes células de las articulaciones, como los condrocitos, podrían ser responsables de este incremento de leptina en respuesta a estímulos biomecánicos o proinflamatorios. En esta línea se ha descrito que los condrocitos muestran una mayor expresión de leptina asociada a una OA más severa (Simopoulou et al., 2007).

Por lo tanto, nuestros datos no apoyan la hipótesis de que la hiperlipidemia podría ser un factor agravante en la OA metabólica mediante la inducción de la expresión de adipquinas de la almohadilla adiposa infrapatelar, pero sugieren que a nivel sistémico podría desempeñar un papel en el deterioro de las articulaciones de los pacientes con OA.

La falta de fármacos efectivos para el tratamiento de la OA hace que su cada vez mayor prevalencia cause un coste tanto económico, como social, de cotas alarmantes. Actualmente la OA es la patología musculoesquelética más común siendo responsable del 50% de la carga que suponen este tipo de patologías.

Además del envejecimiento de la población, uno de los principales factores que contribuye al aumento de incidencia de la OA es la creciente tendencia de las poblaciones occidentales a desarrollar disfunciones metabólicas como el síndrome metabólico o la diabetes. En consecuencia, la investigación en el área cobra cada vez mayor importancia no solo para los enfermos, sino para el conjunto de la sociedad.



---

## 6 CONCLUSIONES

---

1. Los pacientes artrósicos que además tienen diabetes, muestran una tendencia a tener mayor expresión génica de marcadores de hipertrofia condrocitaria en el cartílago articular, en comparación con los pacientes artrósicos sin alteraciones metabólicas identificadas
2. La elevada concentración de glucosa es capaz de inducir la expresión de marcadores de hipertrofia condrocitaria en cultivos de condrocitos artrósicos en 3D.
3. La inducción de estos marcadores es precedida por un acúmulo de proteínas O-GlcNAc. La inhibición de la O-GlcNAc impide la expresión de estos marcadores. Sin embargo, una acumulación de proteínas O-GlcNAc en concentraciones normales de glucosa, no induce la expresión de dichos marcadores.
4. Los mediadores del metabolismo óseo OPG y RANK-L incrementan su expresión como consecuencia de la elevada concentración de glucosa en cultivos de condrocitos artrósicos en 3D, con una disminución significativa del ratio OPG/RANK-L.
5. Es necesario que se produzca un acúmulo de proteínas O-GlcNAc para que una concentración de glucosa elevada incremente RANK-L. Además, el acúmulo de estas proteínas en concentraciones normales de glucosa, también incrementa RANK-L
6. Las lesiones histológicas características del cartílago artrósico no se ven agravadas por la hipercolesterolemia. Sin embargo, ésta induce la expresión génica de los mediadores TGF $\beta$ , TNF y MMP1 implicados en la formación de osteofitos.
7. La hipercolesterolemia incrementa la pérdida de densidad mineral ósea en el hueso subcondral de conejos artrósicos.
8. La membrana sinovial sufre cambios histológicos como consecuencia de la hipercolesterolemia y de la artrosis. Cuando estas dos condiciones están presentes simultáneamente, actúan de forma sinérgica y dan como resultado una sinovial fibrótica y lipoatrófica con una severa invasión de macrófagos.
9. Aunque la hipercolesterolemia incrementa la concentración circulante de leptina, la expresión génica de adipoquinas en la sinovial disminuye en correlación con la pérdida de adipocitos en el tejido. Por tanto, el incremento del daño articular, que se produce como consecuencia de la hipercolesterolemia, no se puede atribuir a una mayor expresión génica de adipoquinas en la membrana sinovial.

---

## 7 BIBLIOGRAFÍA

---

- Abdenmour, M., Reggio, S., Le Naour, G., Liu, Y., Poitou, C., Aron-Wisnewsky, J., Charlotte, F., Bouillot, J.-L., Torcivia, A., Sasso, M., et al. (2014). Association of adipose tissue and liver fibrosis with tissue stiffness in morbid obesity: links with diabetes and BMI loss after gastric bypass. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *99*, 898–907.
- Abella, V., Scotece, M., Conde, J., López, V., Lazzaro, V., Pino, J., Gómez-Reino, J.J., and Gualillo, O. (2014). Adipokines, Metabolic Syndrome and Rheumatic Diseases. *J. Immunol. Res.* *2014*.
- Al-Arfaj, A.S. (2003). Radiographic osteoarthritis and serum cholesterol. *Saudi Med. J.* *24*, 745–747.
- Andrés-Bergós, J., Tardio, L., Larranaga-Vera, A., Gómez, R., Herrero-Beaumont, G., and Largo, R. (2012). The increase in O-GlcNAc protein modification stimulates chondrogenic differentiation both in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*
- Ardura, J.A., Portal-Núñez, S., Lozano, D., Gutiérrez-Rojas, I., Sánchez-Salcedo, S., López-Herradón, A., Mulero, F., Villanueva-Peñacarrillo, M.L., Vallet-Regí, M., and Esbrit, P. (2016). Local delivery of parathyroid hormone-related protein-derived peptides coated onto a hydroxyapatite-based implant enhances bone regeneration in old and diabetic rats. *J. Biomed. Mater. Res. A* *104*, 2060–2070.
- Atayde, S.A., Yoshinari, N.H., Nascimento, D.P., Catanozi, S., Andrade, P.C., Velosa, A.P.P., Parra, E.R., Passarelli, M., Nakandakare, E.R., Capelozzi, V.L., et al. (2012). Experimental diabetes modulates collagen remodelling of joints in rats. *Histol. Histopathol.* *27*, 1471–1479.
- Atukorala, I., Kwoh, C.K., Guermazi, A., Roemer, F.W., Boudreau, R.M., Hannon, M.J., and Hunter, D.J. (2016). SYNOVITIS IN KNEE OSTEOARTHRITIS: A PRECURSOR OF DISEASE? *Ann. Rheum. Dis.* *75*, 390–395.
- Benito, M.J., Sánchez-Pernaute, O., López-Armada, M.J., Hernández, P., Palacios, I., Egido, J., and Herrero-Beaumont, G. (2000). Cyclosporin A prevents the histologic damage of antigen arthritis without inducing fibrosis. *Arthritis Rheum.* *43*, 311–319.
- Benito, M.J., Veale, D.J., FitzGerald, O., Berg, W.B. van den, and Bresnihan, B. (2005). Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *64*, 1263–1267.
- Berenbaum, F. (2013). Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage* *21*, 16–21.
- van den Berg, W.B. (2008). Lessons from animal models of osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* *10*, 26–29.
- Bertuglia, A., Lacourt, M., Girard, C., Beauchamp, G., Richard, H., and Laverty, S. (2016). Osteoclasts are recruited to the subchondral bone in naturally occurring post-traumatic equine carpal osteoarthritis and may contribute to cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* *24*, 555–566.
- Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R., and de Crombrughe, B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.* *22*, 85–89.
- Bijelic, R., Balaban, J., and Milicevic, S. (2016). Correlation of the Lipid Profile, BMI and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women. *Mater. Socio-Medica* *28*, 412–415.

Binette, F., McQuaid, D.P., Haudenschield, D.R., Yaeger, P.C., McPherson, J.M., and Tubo, R. (1998). Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. *J. Orthop. Res.* 16, 207–216.

Blaney Davidson, E.N., Vitters, E.L., van Beuningen, H.M., van de Loo, F. a. J., van den Berg, W.B., and van der Kraan, P.M. (2007). Resemblance of osteophytes in experimental osteoarthritis to transforming growth factor beta-induced osteophytes: limited role of bone morphogenetic protein in early osteoarthritic osteophyte formation. *Arthritis Rheum.* 56, 4065–4073.

de Boer, T.N., van Spil, W.E., Huisman, A.M., Polak, A.A., Bijlsma, J.W.J., Lafeber, F.P.J.G., and Mastbergen, S.C. (2012). Serum adipokines in osteoarthritis; comparison with controls and relationship with local parameters of synovial inflammation and cartilage damage. *Osteoarthritis Cartilage* 20, 846–853.

Bond, M.R., and Hanover, J.A. (2015). A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *J. Cell Biol.* 208, 869–880.

Bord, S., Horner, A., Hembry, R.M., Reynolds, J.J., and Compston, J.E. (1997). Distribution of matrix metalloproteinases and their inhibitor, TIMP-1, in developing human osteophytic bone. *J. Anat.* 191 ( Pt 1), 39–48.

Boström, K.I., Jumabay, M., Matveyenko, A., Nicholas, S.B., and Yao, Y. (2011). Activation of Vascular Bone Morphogenetic Protein Signaling in Diabetes Mellitus. *Circ. Res.* 108, 446–457.

Bourlier, V., Sengenès, C., Zakaroff-Girard, A., Decaunes, P., Wdziekonski, B., Galitzky, J., Villageois, P., Esteve, D., Chiotasso, P., Dani, C., et al. (2012). TGFbeta family members are key mediators in the induction of myofibroblast phenotype of human adipose tissue progenitor cells by macrophages. *PLoS One* 7, e31274.

Boyce, B.F., and Xing, L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys.* 473, 139–146.

Brew, C.J., Clegg, P.D., Boot-Handford, R.P., Andrew, J.G., and Hardingham, T. (2010). Gene expression in human chondrocytes in late osteoarthritis is changed in both fibrillated and intact cartilage without evidence of generalised chondrocyte hypertrophy. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 234–240.

Buechler, C., Krautbauer, S., and Eisinger, K. (2015). Adipose tissue fibrosis. *World J. Diabetes* 6, 548–553.

Bush, P.G., Parisinos, C.A., and Hall, A.C. (2008). The osmotic sensitivity of rat growth plate chondrocytes in situ; clarifying the mechanisms of hypertrophy. *J. Cell. Physiol.* 214, 621–629.

Calvo, E., Castañeda, S., Largo, R., Fernández-Valle, M.E., Rodríguez-Salvanés, F., and Herrero-Beaumont, G. (2007). Osteoporosis increases the severity of cartilage damage in an experimental model of osteoarthritis in rabbits. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 15, 69–77.

Caron, M.M.J., Emans, P.J., Surtel, D.A.M., van der Kraan, P.M., van Rhijn, L.W., and Welting, T.J.M. (2015). BAPX-1/NKX-3.2 Acts as a Chondrocyte Hypertrophy Molecular Switch in Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* 67, 2944–2956.

- Castañeda, S., Roman-Blas, J.A., Largo, R., and Herrero-Beaumont, G. (2013). Osteoarthritis: a progressive disease with changing phenotypes. *Rheumatology* 52, 247.
- Chadha, R. (2016). Revealed aspect of metabolic osteoarthritis. *J. Orthop.* 13, 347–351.
- Chiba, K., Uetani, M., Kido, Y., Ito, M., Okazaki, N., Taguchi, K., and Shindo, H. (2012). Osteoporotic changes of subchondral trabecular bone in osteoarthritis of the knee: a 3-T MRI study. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* 23, 589–597.
- Chouhan, S., Singh, S., Athavale, D., Ramteke, P., Pandey, V., Joseph, J., Mohan, R., Shetty, P.K., and Bhat, M.K. (2016). Glucose induced activation of canonical Wnt signaling pathway in hepatocellular carcinoma is regulated by DKK4. *Sci. Rep.* 6.
- Cillero-Pastor, B., Eijkel, G., Kiss, A., Blanco, F.J., and Heeren, R.M.A. (2012). Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry-Based Molecular Distribution Distinguishing Healthy and Osteoarthritic Human Cartilage. *Anal. Chem.* 84, 8909–8916.
- Clockaerts, S., Bastiaansen-Jenniskens, Y.M., Runhaar, J., Van Osch, G.J.V.M., Van Offel, J.F., Verhaar, J. a. N., De Clerck, L.S., and Somville, J. (2010). The infrapatellar fat pad should be considered as an active osteoarthritic joint tissue: a narrative review. *Osteoarthritis Cartilage* 18, 876–882.
- Conde, J., Scotece, M., López, V., Abella, V., Hermida, M., Pino, J., Lago, F., Gómez-Reino, J.J., and Gualillo, O. (2014). Differential expression of adipokines in infrapatellar fat pad (IPFP) and synovium of osteoarthritis patients and healthy individuals. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 631–633.
- Courties, A., and Sellam, J. (2016). Osteoarthritis and type 2 diabetes mellitus: What are the links? *Diabetes Res. Clin. Pract.* 122, 198–206.
- Dahaghin, S., Bierma-Zeinstra, S.M.A., Koes, B.W., Hazes, J.M.W., and Pols, H. a. P. (2007). Do metabolic factors add to the effect of overweight on hand osteoarthritis? The Rotterdam Study. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 916–920.
- Dao, D.Y., Jonason, J.H., Zhang, Y., Hsu, W., Chen, D., Hilton, M.J., and O’Keefe, R.J. (2012). Cartilage-specific  $\beta$ -CATENIN signaling regulates chondrocyte maturation, generation of ossification centers, and perichondrial bone formation during skeletal development. *J. Bone Miner. Res.* 27, 1680–1694.
- Davies-Tuck, M.L., Hanna, F., Davis, S.R., Bell, R.J., Davison, S.L., Wluka, A.E., Adams, J., and Cicuttini, F.M. (2009). Total cholesterol and triglycerides are associated with the development of new bone marrow lesions in asymptomatic middle-aged women - a prospective cohort study. *Arthritis Res. Ther.* 11, R181.
- DeGroot, J., Verzijl, N., Jacobs, K.M.G., Budde, M., Bank, R.A., Bijlsma, J.W.J., TeKoppele, J.M., and Lefeber, F.P.J.G. (2001). Accumulation of advanced glycation endproducts reduces chondrocyte-mediated extracellular matrix turnover in human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 9, 720–726.
- Deng, Y., and Scherer, P.E. (2010). Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1212, E1–E19.

- Divoux, A., Tordjman, J., Lacasa, D., Veyrie, N., Hugol, D., Aissat, A., Basdevant, A., Guerre-Millo, M., Poitou, C., Zucker, J.-D., et al. (2010). Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes* 59, 2817–2825.
- Dreier, R. (2010). Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res. Ther.* 12, 216.
- Dumond, H., Presle, N., Terlain, B., Mainard, D., Loeuille, D., Netter, P., and Pottie, P. (2003). Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 3118–3129.
- Dumond, H., Presle, N., Pottie, P., Pacquelet, S., Terlain, B., Netter, P., Gepstein, A., Livne, E., and Jouzeau, J.-Y. (2004). Site specific changes in gene expression and cartilage metabolism during early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 284–295.
- Eymard, F., and Chevalier, X. (2016). Inflammation of the infrapatellar fat pad. *Joint Bone Spine* 83, 389–393.
- Eymard, F., Parsons, C., Edwards, M.H., Petit-Dop, F., Reginster, J.-Y., Bruyère, O., Richette, P., Cooper, C., and Chevalier, X. (2015). Diabetes is a risk factor for knee osteoarthritis progression. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 23, 851–859.
- Farnaghi, S., Prasad, I., Cai, G., Friis, T., Du, Z., Crawford, R., Mao, X., and Xiao, Y. (2016). Protective effects of mitochondria-targeted antioxidants and statins on cholesterol-induced osteoarthritis. *FASEB J.* fj.201600600R.
- Fasshauer, M., and Blüher, M. (2015). Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 461–470.
- Filip, A., Bianchi, A., Mainard, D., Lacolley, P., Magdalou, J., and Mercier, N. (2015). A simple two dimensional culture method to study the hypertrophic differentiation of rat articular chondrocytes. *Biomed. Mater. Eng.* 25, 87–102.
- Filková, M., Lisková, M., Hulejová, H., Haluzík, M., Gatterová, J., Pavelková, A., Pavelka, K., Gay, S., Müller-Ladner, U., and Senolt, L. (2009). Increased serum adiponectin levels in female patients with erosive compared with non-erosive osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 295–296.
- Forriol Campos, F. (2002). El cartílago articular: aspectos mecánicos y su repercusión en la reparación tisular. *Rev. Esp. Cir. Ortopédica Traumatol.* 46, 380–390.
- Frey, M.I., Barrett-Connor, E., Sledge, P.A., Schneider, D.L., and Weisman, M.H. (1996). The effect of noninsulin dependent diabetes mellitus on the prevalence of clinical osteoarthritis. A population based study. *J. Rheumatol.* 23, 716–722.
- García-Hernández, A., Arzate, H., Gil-Chavarría, I., Rojo, R., and Moreno-Fierros, L. (2012). High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. *Bone* 50, 276–288.
- Garessus, E.D.G., de Mutsert, R., Visser, A.W., Rosendaal, F.R., and Kloppenburg, M. No association between impaired glucose metabolism and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*.
- Gauci, S.J., Golub, S.B., Tutolo, L., Little, C.B., Sims, N.A., Lee, E.R., Mackie, E.J., and Fosang, A.J. (2008). Modulating chondrocyte hypertrophy in growth plate and osteoarthritic cartilage. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 8, 308–310.

- Giaginis, C., Papadopoulou, A., Zira, A., Katsargyris, A., Klonaris, C., and Theocharis, S. (2012). Correlation of plasma osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of the nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) levels with clinical risk factors in patients with advanced carotid atherosclerosis. *Med. Sci. Monit.* 18, CR597-CR604.
- Gibson, N., Guermazi, A., Clancy, M., Niu, J., Grayson, P., Aliabadi, P., Roemer, F., and Felson, D.T. (2012). Relation of hand enthesophytes with knee enthesopathy: is osteoarthritis related to a systemic enthesopathy? *J. Rheumatol.* 39, 359–364.
- Gierman, L.M., van der Ham, F., Koudijs, A., Wielinga, P.Y., Kleemann, R., Kooistra, T., Stoop, R., Kloppenburg, M., van Osch, G.J.V.M., Stojanovic-Susulic, V., et al. (2012). Metabolic stress-induced inflammation plays a major role in the development of osteoarthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 64, 1172–1181.
- Gierman, L.M., Kühnast, S., Koudijs, A., Pieterman, E.J., Kloppenburg, M., van Osch, G.J.V.M., Stojanovic-Susulic, V., Huizinga, T.W.J., Princen, H.M.G., and Zuurmond, A.-M. (2014). Osteoarthritis development is induced by increased dietary cholesterol and can be inhibited by atorvastatin in APOE\*3Leiden.CETP mice--a translational model for atherosclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 73, 921–927.
- Goldring, M.B. (2012). Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 4, 269–285.
- Goldring, M.B., and Marcu, K.B. (2009). Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 11, 224.
- Goldring, M.B., Otero, M., Plumb, D.A., Dragomir, C., Favero, M., El Hachem, K., Hashimoto, K., Roach, H.I., Olivetto, E., Borzi, R.M., et al. (2011). ROLES OF INFLAMMATORY AND ANABOLIC CYTOKINES IN CARTILAGE METABOLISM: SIGNALS AND MULTIPLE EFFECTORS CONVERGE UPON MMP-13 REGULATION IN OSTEOARTHRITIS. *Eur. Cell. Mater.* 21, 202–220.
- Gómez, R., Conde, J., Scotece, M., Gómez-Reino, J.J., Lago, F., and Gualillo, O. (2011). What's new in our understanding of the role of adipokines in rheumatic diseases? *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 528–536.
- Griffin, T.M., Huebner, J.L., Kraus, V.B., and Guilak, F. (2009). Extreme obesity due to impaired leptin signaling in mice does not cause knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 2935–2944.
- Gualillo, O., Eiras, S., Lago, F., Diéguez, C., and Casanueva, F.F. (2000). Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. *Life Sci.* 67, 2433–2441.
- Hamada, D., Maynard, R., Schott, E., Drinkwater, C.J., Ketz, J.P., Kates, S.L., Jonason, J.H., Hilton, M.J., Zuscik, M.J., and Mooney, R.A. (2016). Suppressive Effects of Insulin on Tumor Necrosis Factor-Dependent Early Osteoarthritic Changes Associated With Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. *Arthritis Rheumatol. Hoboken Nj* 68, 1392–1402.
- Hart, D.J., Doyle, D.V., and Spector, T.D. (1995). Association between metabolic factors and knee osteoarthritis in women: the Chingford Study. *J. Rheumatol.* 22, 1118–1123.
- Hatsell, S., Medina, L., Merola, J., Haltiwanger, R., and Cowin, P. (2003). Plakoglobin Is O-Glycosylated Close to the N-terminal Destruction Box. *J. Biol. Chem.* 278, 37745–37752.



- Haugen, I.K., Ramachandran, V.S., Misra, D., Neogi, T., Niu, J., Yang, T., Zhang, Y., and Felson, D.T. (2015). Hand osteoarthritis in relation to mortality and incidence of cardiovascular disease: data from the Framingham Heart Study. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 74–81.
- Hayami, T., Pickarski, M., Wesolowski, G.A., McLane, J., Bone, A., Destefano, J., Rodan, G.A., and Duong, L.T. (2004). The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum.* **50**, 1193–1206.
- Hemmings, B.A., and Restuccia, D.F. (2012). PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a011189.
- Henrotin, Y., Pesesse, L., and Sanchez, C. (2012). Subchondral bone and osteoarthritis: biological and cellular aspects. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* **23 Suppl 8**, S847-851.
- Herrero-Beaumont, G., Roman-Blas, J.A., Castañeda, S., and Jimenez, S.A. (2009). Primary Osteoarthritis No Longer Primary: Three Subsets with Distinct Etiological, Clinical, and Therapeutic Characteristics. *Semin. Arthritis Rheum.* **39**, 71–80.
- Honsawek, S., and Chayanupatkul, M. (2010). Correlation of Plasma and Synovial Fluid Adiponectin with Knee Osteoarthritis Severity. *Arch. Med. Res.* **41**, 593–598.
- Hoyland, J.A., Thomas, J.T., Donn, R., Marriott, A., Ayad, S., Boot-Handford, R.P., Grant, M.E., and Freemont, A.J. (1991). Distribution of type X collagen mRNA in normal and osteoarthritic human cartilage. *Bone Miner.* **15**, 151–163.
- Hu, P., Bao, J., and Wu, L. (2011). The emerging role of adipokines in osteoarthritis: a narrative review. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 873–878.
- Huebner, J.L., Bay-Jensen, A.C., Huffman, K.M., He, Y., Leeming, D.J., McDaniel, G.E., Karsdal, M.A., and Kraus, V.B. (2014). ALPHA-CTX is associated with subchondral bone turnover and predicts progression of joint space narrowing and osteophytes in osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **66**, 2440–2449.
- Hügle, T., and Geurts, J. What drives osteoarthritis?—synovial versus subchondral bone pathology. *Rheumatology*.
- Ikegami, D., Akiyama, H., Suzuki, A., Nakamura, T., Nakano, T., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N. (2011). Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca-Akt pathways. *Dev. Camb. Engl.* **138**, 1507–1519.
- Imhof, H., Sulzbacher, I., Grampp, S., Czerny, C., Youssefzadeh, S., and Kainberger, F. (2000). Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest. Radiol.* **35**, 581–588.
- Issad, T. (2010). [O-GlcNAc glycosylation and regulation of cell signaling]. *Médecine Sci. MS* **26**, 753–759.
- Iwata, M., Ochi, H., Hara, Y., Tagawa, M., Koga, D., Okawa, A., and Asou, Y. (2013). Initial responses of articular tissues in a murine high-fat diet-induced osteoarthritis model: pivotal role of the IPFP as a cytokine fountain. *PloS One* **8**, e60706.

- Jessica Andres Vergos (2014). La O- $\beta$ -N acetilglicosilación protéica en la hipertrofia del condrocito durante la condrogénesis y la artrosis. Universidad Complutense de Madrid.
- Johnson, V.L., and Hunter, D.J. (2014). The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 28, 5–15.
- van Jonbergen, H.-P.W., Reuver, J.M., Mutsaerts, E.L., and Poolman, R.W. (2014). Determinants of anterior knee pain following total knee replacement: a systematic review. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. Off. J. ESSKA* 22, 478–499.
- Jóźwiak, P., Forma, E., Bryś, M., and Krześlak, A. (2014). O-GlcNAcylation and Metabolic Reprograming in Cancer. *Front. Endocrinol.* 5.
- Jungmann, P.M., Kraus, M.S., Alizai, H., Nardo, L., Baum, T., Nevitt, M.C., McCulloch, C.E., Joseph, G.B., Lynch, J.A., and Link, T.M. (2013). Association of metabolic risk factors with cartilage degradation assessed by T2 relaxation time at the knee: data from the osteoarthritis initiative. *Arthritis Care Res.* 65, 1942–1950.
- Junker, S., Krumbholz, G., Frommer, K.W., Rehart, S., Steinmeyer, J., Rickert, M., Schett, G., Müller-Ladner, U., and Neumann, E. (2015). Differentiation of osteophyte types in osteoarthritis - proposal of a histological classification. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.*
- Kamekura, S., Kawasaki, Y., Hoshi, K., Shimoaka, T., Chikuda, H., Maruyama, Z., Komori, T., Sato, S., Takeda, S., Karsenty, G., et al. (2006). Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum.* 54, 2462–2470.
- Kearns, A.E., Khosla, S., and Kostenuik, P.J. (2008). Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. *Endocr. Rev.* 29, 155–192.
- Kellgren, J.H. (1961). Osteoarthrosis in patients and populations. *BMJ* 2, 1–6.
- King, K.B., and Rosenthal, A.K. (2015). The adverse effects of diabetes on osteoarthritis: update on clinical evidence and molecular mechanisms. *Osteoarthritis Cartilage* 23, 841–850.
- King, K.B., Findley, T.W., Williams, A.E., and Bucknell, A.L. (2013). Veterans with diabetes receive arthroplasty more frequently and at a younger age. *Clin. Orthop.* 471, 3049–3054.
- Koskinen, A., Juslin, S., Nieminen, R., Moilanen, T., Vuolteenaho, K., and Moilanen, E. (2011). Adiponectin associates with markers of cartilage degradation in osteoarthritis and induces production of proinflammatory and catabolic factors through mitogen-activated protein kinase pathways. *Arthritis Res. Ther.* 13, R184.
- van der Kraan, P.M., and van den Berg, W.B. (2007). Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 237–244.
- Krenn, V., Morawietz, L., Häupl, T., Neidel, J., Petersen, I., and König, A. (2002). Grading of Chronic Synovitis — A Histopathological Grading System for Molecular and Diagnostic Pathology. *Pathol. - Res. Pract.* 198, 317–325.

- Krenn, V., Morawietz, L., Burmester, G.-R., Kinne, R.W., Mueller-Ladner, U., Muller, B., and Haupl, T. (2006). Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology* 49, 358–364.
- Ku, J.H., Lee, C.K., Joo, B.S., An, B.M., Choi, S.H., Wang, T.H., and Cho, H.L. (2009). Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis. *Clin. Rheumatol.* 28, 1431–1435.
- Laiguillon, M.-C., Courties, A., Houard, X., Auclair, M., Sautet, A., Capeau, J., Fève, B., Berenbaum, F., and Sellam, J. (2015). Characterization of diabetic osteoarthritic cartilage and role of high glucose environment on chondrocyte activation: toward pathophysiological delineation of diabetes mellitus-related osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 23, 1513–1522.
- Lambert, C., Dubuc, J.-E., Montell, E., Verges, J., Munaut, C., Noel, A., and Henrotin, Y. (2014). Gene Expression Pattern of Cells From Inflamed and Normal Areas of Osteoarthritis Synovial Membrane. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken Nj 66, 960–968.
- Larsson, S., Englund, M., Struglics, A., and Lohmander, L.S. (2015). Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in synovial fluid are associated with progression of radiographic knee osteoarthritis in subjects with previous meniscectomy. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 23, 1906–1914.
- Laurberg, T.B., Frystyk, J., Ellingsen, T., Hansen, I.T., Jørgensen, A., Tarp, U., Hetland, M.L., Hørslev-Petersen, K., Hornung, N., Poulsen, J.H., et al. (2009). Plasma adiponectin in patients with active, early, and chronic rheumatoid arthritis who are steroid- and disease-modifying antirheumatic drug-naïve compared with patients with osteoarthritis and controls. *J. Rheumatol.* 36, 1885–1891.
- Lawson, K.A., Teteak, C.J., Zou, J., Hacquebord, J., Ghatan, A., Zielinska-Kwiatkowska, A., Fernandes, R.J., Chansky, H.A., and Yang, L. (2013). Mesenchyme-specific Knockout of ESET Histone Methyltransferase Causes Ectopic Hypertrophy and Terminal Differentiation of Articular Chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 288, 32119–32125.
- Le Clanche, S., Bonnefont-Rousselot, D., Sari-Ali, E., Rannou, F., and Borderie, D. (2016). Inter-relations between osteoarthritis and metabolic syndrome: A common link? *Biochimie* 121, 238–252.
- Lefebvre, T., and Issad, T. (2015). 30 Years Old: O-GlcNAc Reaches the Age of Reason – Regulation of Cell Signaling and Metabolism by O-GlcNAcylation. *Front. Endocrinol.* 6.
- Li, G., Yin, J., Gao, J., Cheng, T.S., Pavlos, N.J., Zhang, C., and Zheng, M.H. (2013). Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Res. Ther.* 15, 223.
- Li, H., George, D.M., Jaarsma, R.L., and Mao, X. (2016). Metabolic syndrome and components exacerbate osteoarthritis symptoms of pain, depression and reduced knee function. *Ann. Transl. Med.* 4, 133.
- Lin, S., Huang, J., Fu, Z., Liang, Y., Wu, H., Xu, L., Sun, Y., Lee, W.Y.W., Wu, T., Qin, L., et al. (2015). The Effects of Atorvastatin on the Prevention of Osteoporosis and Dyslipidemia in the High-Fat-Fed Ovariectomized Rats. *Calcif. Tissue Int.* 96, 541–551.

- Lin, Y.-J., Yen, C.-N., Hu, Y.-C., Wu, Y.-C., Liao, C.-J., and Chu, I.-M. (2009). Chondrocytes culture in three-dimensional porous alginate scaffolds enhanced cell proliferation, matrix synthesis and gene expression. *J. Biomed. Mater. Res. A* 88A, 23–33.
- Lippiello, L., Walsh, T., and Fienhold, M. (1991). The association of lipid abnormalities with tissue pathology in human osteoarthritic articular cartilage. *Metabolism*. 40, 571–576.
- Little, C.B., Barai, A., Burkhardt, D., Smith, S.M., Fosang, A.J., Werb, Z., Shah, M., and Thompson, E.W. (2009). Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum.* 60, 3723–3733.
- Lübbeke, A., Finckh, A., Puskas, G.J., Suva, D., Lädermann, A., Bas, S., Fritschy, D., Gabay, C., and Hoffmeyer, P. (2013). Do synovial leptin levels correlate with pain in end stage arthritis? *Int. Orthop.* 37, 2071–2079.
- Lugo, L., Villalvilla, A., Gómez, R., Bellido, M., Sánchez-Pernaute, O., Largo, R., Herrero-Beaumont, G., and Roman-Blas, J.A. (2012). Effects of PTH [1-34] on synoviopathy in an experimental model of osteoarthritis preceded by osteoporosis. *Osteoarthritis Cartilage* 20, 1619–1630.
- Lunde, I.G., Aronsen, J.M., Kvaløy, H., Qvigstad, E., Sjaastad, I., Tønnessen, T., Christensen, G., Grønning-Wang, L.M., and Carlson, C.R. (2012). Cardiac O-GlcNAc signaling is increased in hypertrophy and heart failure. *Physiol. Genomics* 44, 162–172.
- Magnusson, K., Hagen, K.B., Østerås, N., Nordsletten, L., Natvig, B., and Haugen, I.K. (2015). Diabetes is associated with increased hand pain in erosive hand osteoarthritis: data from a population-based study. *Arthritis Care Res.* 67, 187–195.
- Mankin, H.J., Dorfman, H., Lippiello, L., and Zarins, A. (1971). Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J. Bone Joint Surg. Am.* 53, 523–537.
- Martínez-Calatrava, M.J., Prieto-Potín, I., Roman-Blas, J.A., Tardio, L., Largo, R., and Herrero-Beaumont, G. (2012). RANKL synthesized by articular chondrocytes contributes to juxta-articular bone loss in chronic arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 14, R149.
- Meding, J.B., Reddeman, K., Keating, M.E., Klay, A., Ritter, M.A., Faris, P.M., and Berend, M.E. (2003). Total Knee Replacement in Patients with Diabetes Mellitus. *Clin. Orthop.* 208–216.
- Meier, U., and Gressner, A.M. (2004). Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin. Chem.* 50, 1511–1525.
- Minina, E., Kreschel, C., Naski, M.C., Ornitz, D.M., and Vortkamp, A. (2002). Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP Signaling Integrates Chondrocyte Proliferation and Hypertrophic Differentiation. *Dev. Cell* 3, 439–449.
- Mobasheri, A. (2012). Glucose: an energy currency and structural precursor in articular cartilage and bone with emerging roles as an extracellular signaling molecule and metabolic regulator. *Front. Endocrinol.* 3.

- Mobasheri, A., Vannucci, S.J., Bondy, C.A., Carter, S.D., Innes, J.F., Arteaga, M.F., Trujillo, E., Ferraz, I., Shakibaei, M., and Martín-Vasallo, P. (2002). Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis. *Histol. Histopathol.* 17, 1239–1267.
- Monira Hussain, S., Wang, Y., Cicuttini, F.M., Simpson, J.A., Giles, G.G., Graves, S., and Wluka, A.E. (2014). Incidence of total knee and hip replacement for osteoarthritis in relation to the metabolic syndrome and its components: a prospective cohort study. *Semin. Arthritis Rheum.* 43, 429–436.
- Moreno-Rubio, J., Herrero-Beaumont, G., Tardio, L., Alvarez-Soria, M.A., and Largo, R. (2010). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and prostaglandin E(2) modulate the synthesis of osteoprotegerin and RANKL in the cartilage of patients with severe knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 62, 478–488.
- Munter, W. de, Geven, E.J.W., Blom, A.B., Walgreen, B., Helsen, M.M.A., Joosten, L. a. B., Roth, J., Vogl, T., Loo, F.A.J. van de, Koenders, M.I., et al. (2017). Synovial macrophages promote TGF- $\beta$  signaling and protect against influx of S100A8/S100A9-producing cells after intra-articular injections of oxidized low-density lipoproteins. *Osteoarthritis Cartilage* 25, 118–127.
- de Munter, W., Blom, A.B., Helsen, M.M., Walgreen, B., van der Kraan, P.M., Joosten, L.A., van den Berg, W.B., and van Lent, P.L. (2013). Cholesterol accumulation caused by low density lipoprotein receptor deficiency or a cholesterol-rich diet results in ectopic bone formation during experimental osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 15, R178.
- de Munter, W., van der Kraan, P.M., van den Berg, W.B., and van Lent, P.L.E.M. (2016a). High systemic levels of low-density lipoprotein cholesterol: fuel to the flames in inflammatory osteoarthritis? *Rheumatol. Oxf. Engl.* 55, 16–24.
- de Munter, W., van den Bosch, M.H., Slöetjes, A.W., Croce, K.J., Vogl, T., Roth, J., Koenders, M.I., van de Loo, F.A., van den Berg, W.B., van der Kraan, P.M., et al. (2016b). High LDL levels lead to increased synovial inflammation and accelerated ectopic bone formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 24, 844–855.
- Musumeci, G., Aiello, F.C., Szychlinska, M.A., Di Rosa, M., Castrogiovanni, P., and Mobasheri, A. (2015). Osteoarthritis in the XXIst Century: Risk Factors and Behaviours that Influence Disease Onset and Progression. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 6093–6112.
- Nagel, A.K., and Ball, L.E. (2014). O-GlcNAc Modification of the runt-Related Transcription Factor 2 (Runx2) Links Osteogenesis and Nutrient Metabolism in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 13, 3381–3395.
- Nagel, A.K., and Ball, L.E. (2015). Chapter Four - Intracellular Protein O-GlcNAc Modification Integrates Nutrient Status with Transcriptional and Metabolic Regulation. In *Advances in Cancer Research*, R.R.D. and L.E. Ball, ed. (Academic Press), pp. 137–166.
- Nieves-Plaza, M., Castro-Santana, L.E., Font, Y.M., Mayor, A.M., and Vilá, L.M. (2013). Association of hand or knee osteoarthritis with diabetes mellitus in a population of Hispanics from Puerto Rico. *J. Clin. Rheumatol. Pract. Rep. Rheum. Musculoskelet. Dis.* 19.
- Oehler, S., Neureiter, D., Meyer-Scholten, C., and Aigner, T. (2002). Subtyping of osteoarthritic synoviopathy. *Clin. Exp. Rheumatol.* 20, 633–640.

- Pertynska-Marczewska, M., Diamanti-Kandarakis, E., Zhang, J., and Merhi, Z. (2015). Advanced glycation end products: A link between metabolic and endothelial dysfunction in polycystic ovary syndrome? *Metab. - Clin. Exp.* *64*, 1564–1573.
- Pesesse, L., Sanchez, C., Delcour, J.-P., Bellahcène, A., Baudouin, C., Msika, P., and Henrotin, Y. (2013). Consequences of chondrocyte hypertrophy on osteoarthritic cartilage: potential effect on angiogenesis. *Osteoarthritis Cartilage* *21*, 1913–1923.
- Portha, B., Picon, L., and Rosselin, G. (1979). Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetologia* *17*, 371–377.
- Prieto-Potín, I., Roman-Blas, J., Martínez-Calatrava, M., Gómez, R., Largo, R., and Herrero-Beaumont, G. (2013). Hypercholesterolemia boosts joint destruction in chronic arthritis. An experimental model aggravated by foam macrophage infiltration. *Arthritis Res. Ther.* *15*, R81.
- Prieto-Potin, I., Largo, R., Roman-Blas, J.A., Herrero-Beaumont, G., and Walsh, D.A. (2015). Characterization of multinucleated giant cells in synovium and subchondral bone in knee osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet. Disord.* *16*, 226.
- Puenpatom, R.A., and Victor, T.W. (2009). Increased prevalence of metabolic syndrome in individuals with osteoarthritis: an analysis of NHANES III data. *Postgrad. Med.* *121*, 9–20.
- Rajamäki, T.J., Jämsen, E., Puolakka, P.A., Nevalainen, P.I., and Moilanen, T. (2015). Diabetes is associated with persistent pain after hip and knee replacement. *Acta Orthop.* *86*, 586–593.
- Remst, D.F.G., Blaney Davidson, E.N., and van der Kraan, P.M. (2015). Unravelling osteoarthritis-related synovial fibrosis: a step closer to solving joint stiffness. *Rheumatol. Oxf. Engl.* *54*, 1954–1963.
- Richard, F., Villars, M., and Thibaud, S. (2013). Viscoelastic modeling and quantitative experimental characterization of normal and osteoarthritic human articular cartilage using indentation. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* *24*, 41–52.
- Richter, M., Trzeciak, T., Owecki, M., Pucher, A., and Kaczmarczyk, J. (2015). The role of adipocytokines in the pathogenesis of knee joint osteoarthritis. *Int. Orthop.* *39*, 1211–1217.
- Robinson, W.H., Lepus, C.M., Wang, Q., Raghu, H., Mao, R., Lindstrom, T.M., and Sokolove, J. (2016). Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*
- Roman-Blas, J.A., Mediero, A., Tardío, L., Portal-Núñez, S., Gratal, P., Herrero-Beaumont, G., and Largo, R. (2017). The combined therapy with chondroitin sulfate plus glucosamine sulfate or chondroitin sulfate plus glucosamine hydrochloride does not improve joint damage in an experimental model of knee osteoarthritis in rabbits. *Eur. J. Pharmacol.* *794*, 8–14.
- van Rooy, M.-J., and Pretorius, E. (2014). Obesity, hypertension and hypercholesterolemia as risk factors for atherosclerosis leading to ischemic events. *Curr. Med. Chem.* *21*, 2121–2129.
- Rosa, S.C., Gonçalves, J., Judas, F., Mobasher, A., Lopes, C., and Mendes, A.F. (2009). Impaired glucose transporter-1 degradation and increased glucose transport and oxidative stress in response to high glucose in chondrocytes from osteoarthritic versus normal human cartilage. *Arthritis Res. Ther.* *11*, R80.

- Rosa, S.C., Rufino, A.T., Judas, F.M., Tenreiro, C.M., Lopes, M.C., and Mendes, A.F. (2011). Role of glucose as a modulator of anabolic and catabolic gene expression in normal and osteoarthritic human chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* 112, 2813–2824.
- Rosenbloom, A.L., and Silverstein, J.H. (1996). Connective tissue and joint disease in diabetes mellitus. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 25, 473–483.
- Ruifrok, A.C., and Johnston, D.A. (2001). Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 23, 291–299.
- Saha, P.K., Liang, G., Elkins, J.M., Coimbra, A., Duong, L.T., Williams, D.S., and Sonka, M. (2011). A New Osteophyte Segmentation Algorithm Using the Partial Shape Model and Its Applications to Rabbit Femur Anterior Cruciate Ligament Transection via Micro-CT Imaging. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 58, 2212–2227.
- Sanchez, C., Deberg, M.A., Piccardi, N., Msika, P., Reginster, J.-Y.L., and Henrotin, Y.E. (2005). Subchondral bone osteoblasts induce phenotypic changes in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 988–997.
- Scanzello, C.R., and Goldring, S.R. (2012). The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* 51, 249–257.
- Schett, G., Kleyer, A., Perricone, C., Sahinbegovic, E., Iagnocco, A., Zwerina, J., Lorenzini, R., Aschenbrenner, F., Berenbaum, F., D'Agostino, M.-A., et al. (2013a). Diabetes is an independent predictor for severe osteoarthritis: results from a longitudinal cohort study. *Diabetes Care* 36, 403–409.
- Schett, G., Kleyer, A., Perricone, C., Sahinbegovic, E., Iagnocco, A., Zwerina, J., Lorenzini, R., Aschenbrenner, F., Berenbaum, F., D'Agostino, M.-A., et al. (2013b). Diabetes is an independent predictor for severe osteoarthritis: results from a longitudinal cohort study. *Diabetes Care* 36, 403–409.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. *Nat. Methods* 9.
- Scotece, M., and Mobasheri, A. (2015). Leptin in osteoarthritis: Focus on articular cartilage and chondrocytes. *Life Sci.* 140, 75–78.
- Sellam, J., and Berenbaum, F. (2013). Is osteoarthritis a metabolic disease? *Joint Bone Spine* 80, 568–573.
- Shibakawa, A., Yudoh, K., Masuko-Hongo, K., Kato, T., Nishioka, K., and Nakamura, H. (2005). The role of subchondral bone resorption pits in osteoarthritis: MMP production by cells derived from bone marrow. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 679–687.
- Shirai, T., Kobayashi, M., Nishitani, K., Satake, T., Kuroki, H., Nakagawa, Y., and Nakamura, T. (2011). Chondroprotective effect of alendronate in a rabbit model of osteoarthritis. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 29, 1572–1577.
- Silberberg, R., Hirshberg, G.E., and Lesker, P. (1977). Enzyme studies in the articular cartilage of diabetic rats and of rats bearing transplanted pancreatic islets. *Diabetes* 26, 732–735.

- Simopoulou, T., Malizos, K.N., Iliopoulos, D., Stefanou, N., Papatheodorou, L., Ioannou, M., and Tsezou, A. (2007). Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 872–883.
- Singh, G., Miller, J.D., Lee, F.H., Pettitt, D., and Russell, M.W. (2002). Prevalence of cardiovascular disease risk factors among US adults with self-reported osteoarthritis: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am. J. Manag. Care* 8, S383-391.
- Slawson, C., Copeland, R.J., and Hart, G.W. (2010). O-GlcNAc signaling: a metabolic link between diabetes and cancer? *Trends Biochem. Sci.* 35, 547–555.
- Smith, M.D. (2011). The Normal Synovium. *Open Rheumatol. J.* 5, 100–106.
- Solomon, L.A., Bérubé, N.G., and Beier, F. (2008). Transcriptional regulators of chondrocyte hypertrophy. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 84, 123–130.
- Sophia Fox, A.J., Bedi, A., and Rodeo, S.A. (2009). The Basic Science of Articular Cartilage. *Sports Health* 1, 461–468.
- Spencer, M., Unal, R., Zhu, B., Rasouli, N., McGehee, R.E., Peterson, C.A., and Kern, P.A. (2011). Adipose Tissue Extracellular Matrix and Vascular Abnormalities in Obesity and Insulin Resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E1990–E1998.
- Stefano, G.B., Challenger, S., and Kream, R.M. (2016). Hyperglycemia-associated alterations in cellular signaling and dysregulated mitochondrial bioenergetics in human metabolic disorders. *Eur. J. Nutr.* 1–7.
- Stockwell, R.A. (1967). Lipid content of human costal and articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* 26, 481–486.
- Studer, D., Millan, C., Öztürk, E., Maniura-Weber, K., and Zenobi-Wong, M. (2012). Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Eur. Cell. Mater.* 24, 118–135; discussion 135.
- Stürmer, T., Sun, Y., Sauerland, S., Zeissig, I., Günther, K.P., Puhl, W., and Brenner, H. (1998). Serum cholesterol and osteoarthritis. The baseline examination of the Ulm Osteoarthritis Study. *J. Rheumatol.* 25, 1827–1832.
- Sun, C., Shang, J., Yao, Y., Yin, X., Liu, M., Liu, H., and Zhou, Y. (2016). O-GlcNAcylation: a bridge between glucose and cell differentiation. *J. Cell. Mol. Med.* 20, 769–781.
- Sun, K., Tordjman, J., Clément, K., and Scherer, P.E. (2013). Fibrosis and Adipose Tissue Dysfunction. *Cell Metab.* 18, 470–477.
- Sutton, S., Clutterbuck, A., Harris, P., Gent, T., Freeman, S., Foster, N., Barrett-Jolley, R., and Mobasher, A. (2009). The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet. J.* 179, 10–24.
- Tarakida, A., Iino, K., Abe, K., Taniguchi, R., Higuchi, T., Mizunuma, H., and Nakaji, S. (2011). Hypercholesterolemia accelerates bone loss in postmenopausal women. *Climacteric* 14, 105–111.



- Tardio, L., Andres, J., Herrero-Beaumont, G., and Largo, R. (2011). Protein o-linked n-acetylglucosamine levels in the cartilage of patients with knee osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 70, A86–A86.
- Taylor, R.P., Parker, G.J., Hazel, M.W., Soesanto, Y., Fuller, W., Yazzie, M.J., and McClain, D.A. (2008). Glucose deprivation stimulates O-GlcNAc modification of proteins through up-regulation of O-linked N-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* 283, 6050–6057.
- Thijssen, E., Caam, A. van, and Kraan, P.M. van der (2015). Obesity and osteoarthritis, more than just wear and tear: pivotal roles for inflamed adipose tissue and dyslipidaemia in obesity-induced osteoarthritis. *Rheumatology* 54, 588–600.
- Tiraloché, G., Girard, C., Chouinard, L., Sampalis, J., Moquin, L., Ionescu, M., Reiner, A., Poole, A.R., and Laverty, S. (2005). Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 52, 1118–1128.
- Tolonen, H., Keil, U., Ferrario, M., Evans, A., and Project, for the W.M. (2005). Prevalence, awareness and treatment of hypercholesterolaemia in 32 populations: results from the WHO MONICA Project. *Int. J. Epidemiol.* 34, 181–192.
- Triantaphyllidou, I.-E., Kalyvoti, E., Karavia, E., Lilis, I., Kypreos, K.E., and Papachristou, D.J. (2013). Perturbations in the HDL metabolic pathway predispose to the development of osteoarthritis in mice following long-term exposure to western-type diet. *Osteoarthritis Cartilage* 21, 322–330.
- Trujillo, M.E., and Scherer, P.E. (2006). Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr. Rev.* 27, 762–778.
- Uchida, K., Satoh, M., Inoue, G., Onuma, K., Miyagi, M., Iwabuchi, K., and Takaso, M. (2015). CD11c+ macrophages and levels of TNF- $\alpha$  and MMP-3 are increased in synovial and adipose tissues of osteoarthritic mice with hyperlipidaemia. *Clin. Exp. Immunol.* 180, 551–559.
- Umpierrez, G.E., Zlatev, T., and Spanheimer, R.G. (1989). Correction of altered collagen metabolism in diabetic animals with insulin therapy. *Matrix Stuttg. Ger.* 9, 336–342.
- Upton, A.R., Holding, C.A., Dharmapatni, A.A.S.S.K., and Haynes, D.R. (2012). The expression of RANKL and OPG in the various grades of osteoarthritic cartilage. *Rheumatol. Int.* 32, 535–540.
- Virtue, S., and Vidal-Puig, A. (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome — An allostatic perspective. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1801, 338–349.
- Wei, Y., and Bai, L. (2016). Recent advances in the understanding of molecular mechanisms of cartilage degeneration, synovitis and subchondral bone changes in osteoarthritis. *Connect. Tissue Res.* 1–17.
- Wei, F., Zhou, J., Wei, X., Zhang, J., Fleming, B.C., Terek, R., Pei, M., Chen, Q., Liu, T., and Wei, L. (2012). Activation of Indian hedgehog promotes chondrocyte hypertrophy and upregulation of MMP-13 in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 20, 755–763.

- Wei, W., Bastiaansen-Jenniskens, Y.M., Suijkerbuijk, M., Kops, N., Bos, P.K., Verhaar, J.A.N., Zuurmond, A.-M., Dell'Accio, F., and van Osch, G.J.V.M. (2016). High fat diet accelerates cartilage repair in DBA/1 mice. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.*
- Wen, C.Y., Chen, Y., Tang, H.L., Yan, C.H., Lu, W.W., and Chiu, K.Y. (2013). Bone loss at subchondral plate in knee osteoarthritis patients with hypertension and type 2 diabetes mellitus. *Osteoarthritis Cartilage* 21, 1716–1723.
- Wittenauer, R., Smith, L., and Aden, K. (2013). Priority Medicines for Europe and the World “A Public Health Approach to innovation” Background Paper 6.12 Osteoarthritis.
- Wong, M., and Carter, D.R. (2003). Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone* 33, 1–13.
- Wu, L., and Derynck, R. (2009). Essential role of TGF- $\beta$  signaling in glucose-induced cell hypertrophy. *Dev. Cell* 17, 35–48.
- Yadav, A., Jyoti, P., Jain, S.K., and Bhattacharjee, J. (2011). Correlation of Adiponectin and Leptin with Insulin Resistance: A Pilot Study in Healthy North Indian Population. *Indian J. Clin. Biochem.* 26, 193–196.
- Yoshimura, N., Muraki, S., Oka, H., Tanaka, S., Kawaguchi, H., Nakamura, K., and Akune, T. (2015). Mutual associations among musculoskeletal diseases and metabolic syndrome components: A 3-year follow-up of the ROAD study. *Mod. Rheumatol. Jpn. Rheum. Assoc.* 25, 438–448.
- Zachara, N.E., and Hart, G.W. (2004). O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1673, 13–28.
- Zeng, X., Zhan, K., Zhang, L., Zeng, D., Yu, W., Zhang, X., Zhao, M., Lai, Z., and Chen, R. (2017). The impact of high total cholesterol and high low-density lipoprotein on avascular necrosis of the femoral head in low-energy femoral neck fractures. *J. Orthop. Surg.* 12.
- Zhang, L., Song, H., and Zhao, X. (2009). Optimum Combination of Insulin-Transferrin-Selenium and Fetal Bovine Serum for Culture of Rabbit Articular Chondrocytes in Three-Dimensional Alginate Scaffolds. *Int. J. Cell Biol.* 2009.
- Zhang, L., Hu, H., Tian, F., Song, H., and Zhang, Y. (2011). Enhancement of subchondral bone quality by alendronate administration for the reduction of cartilage degeneration in the early phase of experimental osteoarthritis. *Clin. Exp. Med.* 11, 235–243.
- Zhong, L., Huang, X., Karperien, M., and Post, J.N. (2015). The Regulatory Role of Signaling Crosstalk in Hypertrophy of MSCs and Human Articular Chondrocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 19225–19247.
- Zhou, J., Chen, Q., Lanske, B., Fleming, B.C., Terek, R., Wei, X., Zhang, G., Wang, S., Li, K., and Wei, L. (2014). Disrupting the Indian hedgehog signaling pathway in vivo attenuates surgically induced osteoarthritis progression in Col2a1-CreER T2 ; Ihhfl/fl mice. *Arthritis Res. Ther.* 16, R11.
- Zhuo, Q., Yang, W., Chen, J., and Wang, Y. (2012). Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*

---

## 8 APORTACIONES CIENTÍFICAS

---

**Los resultados de esta tesis han sido parcialmente publicados en:**

Villalvilla A\*, Larrañaga-Vera A\*, Perez-Baos S, Herrero-Beaumont G, Largo R. While diet-induced hypercholesterolemia does not aggravate experimental osteoarthritis, oxLDL show anti-inflammatory effects on human chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 2017. Submitted.

Larrañaga-Vera A, Lamuedra A, Pérez-Baos A, Prieto-Potin I, Peña L, Herrero-Beaumont G, Largo R. Synovial Lipodystrophy Induced by Hypercholesterolemia Aggravates Synovitis in an Experimental Rabbit Model of Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2017. Submitted.

**Otros trabajos publicados durante el desarrollo de la tesis son:**

Tardio, L., Andrés-Bergós, J., Zachara, N.E., Larrañaga-Vera, A., Rodriguez-Villar, C., Herrero-Beaumont, G., and Largo, R.. O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) protein modification is increased in the cartilage of patients with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2014. 22, 259–263.

Andrés-Bergós, J., Tardio, L., Larranaga-Vera, A., Gómez, R., Herrero-Beaumont, G., and Largo, R.. The increase in O-linked N-acetylglucosamine protein modification stimulates chondrogenic differentiation both in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 2012. 287, 33615–33628.

**Los resultados han sido también presentados en las siguientes reuniones científicas:**

Synovial lipodystrophy induced by hypercholesterolemia aggravates synovitis in an experimental model of osteoarthritis in rabbits. A. Larrañaga-Vera, S. Perez-Baos, I. Prieto-Potin, F. Lopez-Oliva, L. Peña, G. Herrero-Beaumont, R. Largo. World Congress of the Osteoarthritis Research Society International. Amsterdam, March-April 2016.

O-Linked N-Acetylglucosamine Modified Proteome of Human Osteoarthritic Cartilage: Biological Significance. J. Andrés-Bergós, M.L. Hernáez, M. Otero, A. Larranaga-Vera, S. Pérez-Baos, M.B. Goldring, G. Herrero-Beaumont, R. Largo. ACR/ARHP American Annual Meeting, San Diego. Oct. 2013.

Biological role of the O-linked N-acetylglucosamine modified proteome in human osteoarthritic cartilage. J. Andres-Bergos, M. Hernáez, M. Otero, A. Larrañaga-Vera, S. Perez-Baos, M.B. Goldring, G. Herrero-Beaumont, R. Largo. World Congress of the Osteoarthritis Research Society International. Paris, April 2014.